

Expression und Aufreinigung von Cx43-Halbkanälen für ESR-Untersuchungen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer.nat.

des Fachbereichs

Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur

an der

Universität GH Essen

vorgelegt von

Oliver Burlon

aus Marburg

Oktober 2000

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Anatomie der Universität GH Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. E. Winterhager

2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. J. Thomale

3. Gutachter

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. J. Thomale

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2001

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1.	Struktur und Funktion der GJ-Kanäle	1
1.2.	Der dodekamere Kanal wird von 48 transmembranen α -Helices bebildet	3
1.3.	Model für das „Docking“ zweier Connexone	4
1.4.	Auflösungsgrenze des bisherigen Strukturmodells der GJ-Kanäle	5
1.5.	Ursachen für die geringe Auflösung der Elektronen-Kryo- Mikroskopie	6
1.6.	ESR-Spektroskopie zur Aufklärung der Struktur und Funktion der Gap Junction Kanäle	7
1.7.	Expressionssysteme	9
1.8.	Probenreinheit und Erhalt der Funktionalität	10
1.9.	Zielsetzung	11
2.	Material und Methoden	12
2.1.	Material	12
2.1.1.	Chemikalien und Enzyme	12
2.1.2.	Sonstige Materialien	13
2.1.3.	Bakterienstämme	13
2.1.4.	Zelllinien	13
2.1.5.	Plasmide	13
2.1.6.1.	Nährmedien	14
2.1.6.2.	Zellkulturmedien	14
2.1.7.	Antibiotikazusätze zu den Medien	14
2.1.8.	Antikörper	14
2.1.9.	Puffer und Lösungen	15
2.1.10.	Oligonucleotide	17
2.2.	Methoden	18
2.2.1.	Molekularbiologische Methoden	18
2.2. 1.1.	Mutagenese durch PCR-Overlap-Extension	18
2.2.1.2.	Mini- und Maxipräparation von Plasmid-DNA	18
2.2.1.3.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	18
2.2.1.4.	Konzentrationsbestimmung von DNA	19
2.2.1.5.	DNA-Sequenzierung	19
2.2.2.	Mikrobiologische Methoden	19
2.2.2.1.	Lagerung von Bakterien	19

2.2.2.2.	Anzucht von Bakterienkulturen	19
2.2.2.3.	Herstellung transformationskompetenter E.coli	19
2.2.2.4.	Transformation kompetenter E. coli durch Elektroporation	19
2.2.3.	Zellen und Zellkultur	20
2.2.3.1.	Kultivierung von Zellen	20
2.2.3.2.	Transiente Transfektion von HeLa-Zellen	20
2.2.3.3.	Stabile Transfektion von HeLa-Zellen	20
2.2.3.4.	Baculovirus vermittelte Transfektion von Insektenzellen	21
2.2.3.5.	Transiente Transfektion von Insektenzellen	21
2.2.3.6.	Stabile Transfektion von Insektenzellen	21
2.2.3.7.	Immunhistochemie	21
2.2.4.	Biochemische Methoden	22
2.2.4.1.	In vitro Transkription und Translation	22
2.2.4.2.	Dichtegradientenzentrifugation	22
2.2.4.3.	Isolation von Connexinproteinen	22
2.2.4.3.1.	Theorie zur Solubilisierung von Membranproteinen	22
2.2.4.3.2.	Solubilisierung von Cx-Halbkanälen aus transfizierten High Five Insektenzellen	23
2.2.4.4.	Dialyse kleiner Volumina zur Aggregation von Halbkanälen	24
2.2.4.5.	Gelfiltration Superose 6 PG mit Eichung	24
2.2.4.6.	Proteinkonzentrationsbestimmungen	25
2.2.4.7.	Ni-NTA-Affinitätschromatographie	25
2.2.4.8.	Dot Blot Densitometrie	25
2.2.4.9.	Elektrophorese von Proteinen	25
2.2.4.10.	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	25
2.2.4.11.	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	26
2.2.4.12.	Dot Blot	26
2.2.4.13.	Chemolumineszenz	26
2.2.4.14.	Ultrafiltration	26
2.2.5.	Biophysikalische Methoden	26
2.2.5.1.	Szintillationszählung	26
2.2.5.2.	Spinmarkierung	27
2.2.5.3.	ESR-Spektroskopie	27
2.2.5.4.	Aufbau des Elektronen-Spin-Resonanz-Spektrometers	28
2.2.5.5.	cw-ESR-Spektroskopie bei Raumtemperatur	30
2.2.5.6.	Spinzahlbestimmung	30

3.	Ergebnisse	32
3.1.	Vorüberlegung	32
3.2.	Expression von Connexinen	32
3.2.1.	Expression von Cx46 durch ein gekoppeltes in vitro Transkription- und Translationssysteme	32
3.2.2.	Expression von 6xHis-Cx46 in Sf9 Insektenzellen durch eine Baculovirus vermittelte Transfektion	34
3.2.3.	Expression von 6xHis-Cx46 in HeLa Zellen	35
3.2.4.	Stabile Transfektion von Insektenzellen mit Cx43-6xHis	38
3.2.5.	Ortspezifische Mutagenese	41
3.3.	Aufreinigung der Connexine	43
3.3.1.	Aufreinigung durch ein 6xHis-Epitop	44
3.3.2.	Zweischritt-Gelfiltration zur Aufreinigung von Cx43-Halbkanälen	48
3.4.	ESR-Spektroskopie	55
4.	Diskussion	57
4.1.	Expressionssysteme	57
4.1.1.	Expression von Connexinen in Insektenzellen	57
4.1.1.1.	Exprimierte Proteinmenge	57
4.1.1.2.	Lokalisation der Connexine in der Zelle	58
4.1.2.	Isolation von Connexinen aus Geweben	59
4.1.3.	In vitro Translationssysteme	60
4.2.	Isolationssysteme - Aufreinigung unter nicht denaturierenden Bedingungen	61
4.2.1.	Aufreinigung durch Zellfraktionierung und Dichtegradientenzentrifugation	61
4.2.2.	Solubilisierung und Gelfiltration	64
4.2.3.	Solubilisierung und Aufreinigung durch ein 6xHis-Epitop	66
4.3.	Untersuchung von Halbkanälen	66
4.4.	ESR-Spektroskopie	67
4.5.	Ausblick	68
5.	Zusammenfassung	69
6.	Anhang	71
7.	Literatur	73

8.	Abkürzungen	83
9.	Danksagung	84
10.	Lebenslauf	85
11.	Erklärung	87

1. Einleitung

Gap Junction Membrankanäle ermöglichen benachbarten Zellen Ionen, Metabolite und Moleküle bis zu einer Größe von 1 kD mittels passiver Diffusion auszutauschen. Diese Kopplung des Cytosols benachbarter Zellen, die zu einer Zell-Zell-Kommunikation führt, ermöglicht die Koordinierung metabolischer und elektrischer Aktivitäten von Geweben.

1.1. Struktur und Funktion der GJ-Kanäle

Elektronenmikroskopische Untersuchungen (Unwin und Zampighi, 1980) und Röntgenbeugungsversuche (Caspar *et al.*, 1977, Makowski *et al.*, 1977) gaben erste Hinweise über die Struktur der Gap Junction. Es konnte gezeigt werden, daß Gap Junctions aus zwei hexameren Untereinheiten bestehen, die in jeweils gegenüberliegenden Zellmembranen eingebaut sind und im Interzellularraum zusammentreffen (Abb. 1.1. a)).

Unwin (1986) schlug aufgrund von Hydrophatieanalysen eine α -helikale Struktur der Transmembranendomänen vor. Der Einsatz von Proteasen, Immunomarkierungen und Hydrophatieuntersuchungen erweiterte das Strukturmodell der Connexine dahingehend, daß jede Connexinuntereinheit die Membran viermal durchspannt, wobei sich N- und C-Terminus im Cytosol befinden (Yeager and Nicholson, 1996, Yeager, 1998).

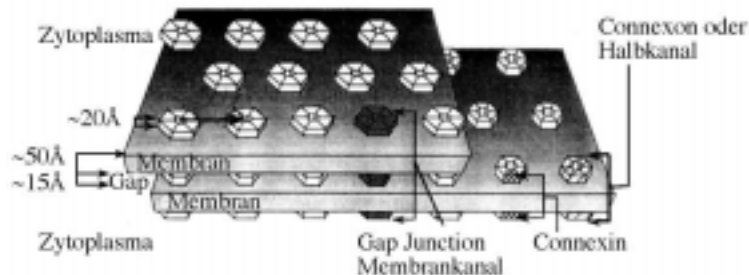
Jede Gap Junction besteht aus bis zu einigen tausend solcher Membrankanäle. Moleküle mit einer Molekularmasse von maximal 1000 Da (Loewenstein, 1981) können die wassergefüllte Pore, deren Durchmesser zwischen 10 und 20 Å beträgt, passieren. Auf diese Weise können Ionen, Metabolite sowie Signalmoleküle passiv in benachbarte Zellen transportiert werden. In erregbaren Geweben ist die Leitung von Ionen über Gap Junctions wichtig für die schnelle Ausbreitung und Koordination von elektrischen Signalen (Barr *et al.*, 1965). So wird während des Geburtsvorganges die Erregung bei der Kontraktion der Uterusmuskulatur über Gap Junction Kanäle weitergeleitet (Garfield *et al.*, 1977, 1978; Garfield and Hayashi, 1980). Die Regulation der Cx-Expression geschieht auf hormonellem Weg. So kommt es kurz vor der Geburt bei Ratten und Kaninchen durch eine Erhöhung des Östrogenspiegels und einem Abfall des Progesterons zu einer zunehmenden Expression von Cx26 und Cx43 im Myometrium (Ou *et al.*, 1997).

In nicht erregbaren Geweben spielt der Austausch von Molekülen via Gap Junctions eine wichtige Rolle für die Homöostase, das Wachstum und die Differenzierung von Geweben (Bennett *et al.*, 1991), insbesondere während der Gravidität und Entwicklung des Embryos.

Mäuse, bei denen das Cx43-Gen ausgeschaltet wurde, sterben direkt nach der Geburt aufgrund einer Herzfehlbildung (Reaume *et al.*, 1995). Ein Knock-Out des Cx26-Gens führt bei Mäusen zum Absterben des Embryos. Verantwortlich dafür sind die Cx26-Kanäle in der Placenta, deren Fehlen zu einer Unterversorgung des Embryos mit Nährstoffen führt (Gabriel *et al.*, 1998). Ein weiteres Beispiel für die Funktion von Connexinen stellt die Augenlinse dar, die frei von Blutgefäßen ist und via Cx46 und Cx50 Gap Junctions mit Nährstoffen versorgt wird (Goodenough *et al.*, 1980).

Eine Cx46 Inaktivierung bei Mäusen führt zu einer Trübung der Augenlinse, was zeigt, daß Cx46 für den Erhalt der Transparenz der Augenlinse wichtig ist (Gong *et al.*, 1996).

a)



b)

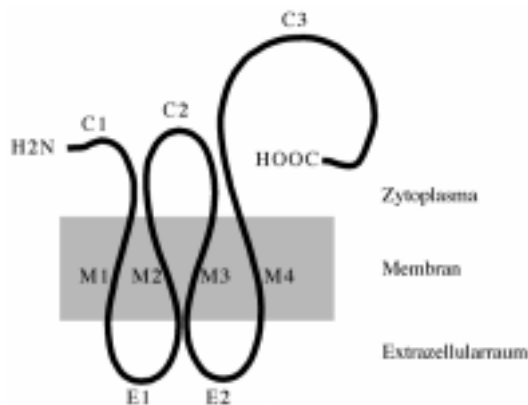


Abb. 1.1.: Modell der Gap Junction Struktur. a) Jedes Connexon ist ein aus Connexinen gebildetes Hexamer. Zwei sich gegenüberliegende Connexone docken zusammen, um einen Membrankanal zu bilden. b) Faltungsschema eines Connexins bestehend aus den vier Membrandomänen (M1-M4), zwei extrazellulären Loops (E1 und E2) und den drei cytosolischen Domänen (Aminoterminus (C1), cytoplasmatische Schleife (C2) und der Carboxyterminus (C3) (nach Ghoshroy *et al.*, 1995).

Molekularbiologische Untersuchungen zeigten, daß die Connexine als monomerer Baustein der Gap Junction Membran Proteine eine Multigenfamilie darstellen (Beyer *et al.*, 1990; Willecke *et al.*, 1991; Kumar and Gilula, 1992, 1996; Bruzzone *et al.*, 1996; Goodenough *et al.*, 1996). Bisher wurden 16 verschiedene Connexin-Typen im murinen Genom charakterisiert.

Die transmembranen Domänen und die extrazellulären Loops sind bei allen Mitgliedern der Cx-Familie hoch konserviert und werden für die Kanalstruktur verantwortlich gemacht, während die cytoplasmatischen Bereiche weniger stark konserviert sind und für die unterschiedliche Regulation von Gap Junction Kanälen verantwortlich sein könnten (Dermitzel *et al.*, 1990).

Aufgrund der Aminosäuresequenz werden Connexine in eine α und eine β Gruppe aufgeteilt. Die α -Connexine besitzen eine längere cytosolische Loopregion sowie einen bedeutend längeren C-

Terminus. Die gebräuchliche Connexin-Nomenklatur setzt hinter das Connexinkürzel Cx den Betrag der Molekularmasse in kDa.

Die unterschiedlichen Connexingene besitzen im allgemeinen einen ähnlichen Aufbau. Sie bestehen aus zwei Exons, die durch ein Intron variabler Länge getrennt sind. Die codierende Region befindet sich ausschließlich in Exon 2. Neuere Untersuchungen belegen, daß dieses Muster der genetischen Struktur nicht allgemeingültig ist. So besitzt Cx36, das hauptsächlich in neuronalen Zellen expremiert wird, ein Intron inmitten der codierenden Region. Dieser Befund gab Anlaß zur Definition einer γ Gruppe (O'Brien *et al.*, 1998)

Physiologische Untersuchungen mittels des *Xenopus* gepaarten Oozytensystems oder mittels der Transfektion kopplungsdefizienter Zellen ergaben, daß auch Connexone, die aus jeweils verschiedenen Connexinen aufgebaut sind, sich zu heterologen Paaren zusammensetzen können (Dahl *et al.*, 1987, Elfgang *et al.*, 1995).

Die Permeabilität von Gap Junction Kanälen wird von verschiedenen Faktoren beeinflußt. So spielen die Änderung der Konzentration freien intrazellulären Kalziums (Rose and Loewenstein, 1975), der pH-Wert (Spray *et al.*, 1981), die über die Zellmembranen abfallende Spannung (Bennett *et al.*, 1992), Wachstumsfaktoren (Maldonado *et al.*, 1988; Lau *et al.*, 1992) sowie onkogene Aktivitäten (Atkinson and Sheridan, 1985; Azarnia *et al.*, 1988) eine wichtige Rolle in der Regulation eines Gap Junction Kanals. Die für die Änderung der Gap Junction Kanal Permeabilität verantwortlichen Mechanismen sind bisher nicht verstanden. Jedoch konnte gezeigt werden, daß sich Halbkanäle meist unabhängig voneinander verhalten (Versalies *et al.*, 1987; Bennett *et al.*, 1988, Swenson *et al.*, 1989, Werner *et al.*, 1989).

Bekannt ist, daß eine Phosphorylierung der Connexine, die durch unterschiedliche Mediatoren und Enzyme verursacht werden kann, im Zusammenhang mit dem Öffnen-Schließen-Mechanismus der Gap Junction Kanäle steht (Loewenstein, 1984; Stagg and Fletcher, 1990). So führt eine Tyrosinphosphorylierung bei Cx43 zu einer Hemmung der interzellulären Kommunikation (Swenson *et al.*, 1990). Die Gap Junction Membran Kanäle sind nicht permanent geöffnet. Durch eine reversible Konformationsänderung wechseln sie zwischen einem offenen und geschlossenen Zustand. Messungen der Leitfähigkeit von Einzelkanälen legen nahe, daß dieser Übergang ohne Zwischenstufen erfolgt (Burt and Spray, 1988; Fishman *et al.*, 1990).

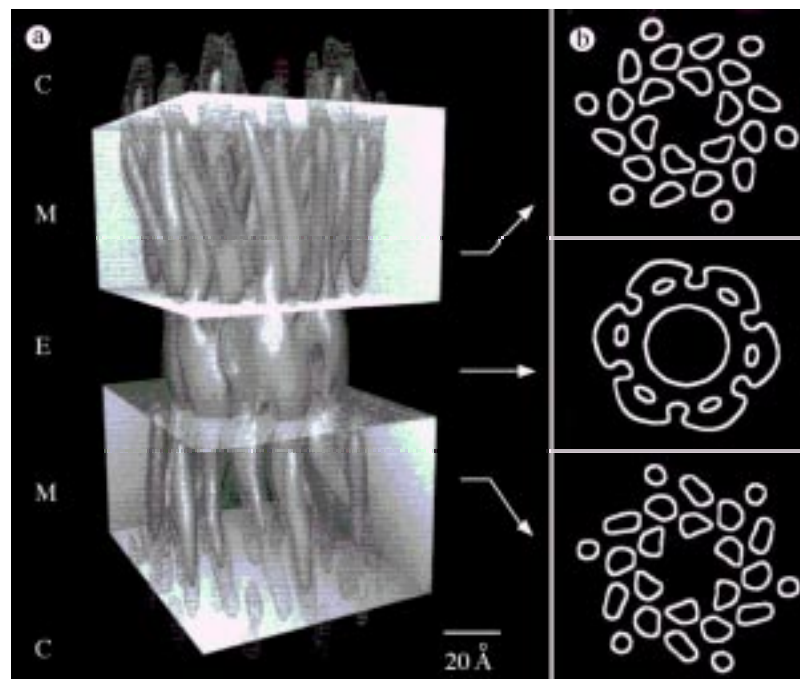
1.2. Der dodekamere Kanal wird von 48 transmembranen α -Helices gebildet

Den derzeitigen Stand der Strukturaufklärung von Gap Junction Membrankanälen markieren die Elektronen-Kryo-Mikroskopie-Arbeiten von Unger *et al.* (1999 a, b). Nach einer Detergenzextraktion stellen die Membrankanäle einer Gap Junction ein zweidimensionales Kristall dar. Mittels der Elektronen-Kryo-Mikroskopie, die sich die Beugungserscheinungen an einem solchen Kristall zu nutze macht, kann unter Zuhilfenahme von Bildbearbeitungsprogrammen auf die Struktur dieser Kristalle geschlossen werden.

Unger *et al.* (1999 a, b) konnten durch die Bildverarbeitung unterschiedlich geneigter 2D-Kristalle eine 3D Kartierung mit einer Auflösung von 7.5 \AA in der x, y Ebene der Membran und 21 \AA in der z Ebene der Membran durchführen.

In der 3D-Karte (Abb. 1.2.) können die transmembranen Regionen von den extrazellulären unterschieden werden. Der Durchmesser in der transmembranen Region beträgt ca. 70 \AA , der der extrazellulären ca. 55 \AA . Die wassergefüllte Pore des Gap Junction Kanals verengt sich von ca. 40 auf 15 \AA aus Richtung des Cytosol zum Extrazellularraum betrachtet. Unger *et al.* (1999 a, b) erhielten bei Schnitten parallel zur Membranebene durch ein Connexon 24 Flecken hoher Dichte, wie sie für α -Helices typisch sein können. Da ein Gap Junction Kanal aus zwei Connexonen gebildet wird, besitzt ein Kanal folglich 48 α -Helices.

Abb. 1.2.: 3D-Karte des rekombinanten Cx43 Gap Junction Membrankanals: a) Seitenansicht und b) Blick in das Innere eines Kanals. Die vermuteten Grenzen für die Doppelmembranen (M) und den extrazellulären Spalt (E) sowie das Cytosol (C) sind angegeben. Die Pfeile verdeutlichen die Stelle der c) parallel zur Membran durchgeführten Querschnitte. Die nahezu kreisförmigen Konturen innerhalb der hydrophoben Region der Doppelmembran verdeutlicht die 24 α -Helices pro Connexon. (nach Unger *et al.*, 1999 a)



1.3. Model für das „Docking“ zweier Connexone

Der Extrazellulärbereich des Gap Junction Kanals weist bei Untersuchungen durch die Elektronen-Kryo-Mikroskopie ein kontinuierliches Dichteband mit einem Durchmesser von etwa 17 \AA sowie sechs Dichtebögen mit einem Radius von etwa 26 \AA auf. Das Dichtebild des Extrazellulärbereichs unterscheidet sich damit stark vom Dichtebild des Transmembranbereichs des Gap Junction Kanals. Dieser Unterschied deutet darauf hin, daß die Polypeptidkette im Extrazellulärbereich keine α -helicale Sekundärstruktur aufweist.

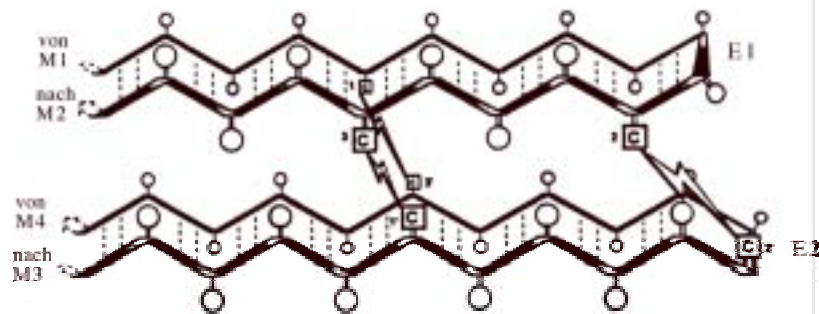
Das innere Dichteband bildet eine durchgehende Begrenzung bestehend aus Protein, die den Extrazellulärraum vom Kanalinneren elektrisch und chemisch isoliert.

Ein interessantes Ergebnis der Arbeiten von Unger *et al.* (1999 a, b) ist die Verschiebung der sich entsprechenden α -Helices um 30° in den gegenüberliegenden Connexonen. Unter der Voraussetzung, daß eine einzelne Connexinuntereinheit einen kreisförmigen Querschnitt parallel zur Membranebene besitzt, müssten die beiden Connexone versetzt zueinander stehen (Unger *et al.*, 1997, Perkins *et al.*, 1998).

Ortsspezifische Mutationen innerhalb der extrazellulären Loops von Cx32 legen die Vermutung nahe, daß diese Proteinbereiche als antiparallele β -Faltblätter vorliegen (Foote *et al.*, 1998). Diese β -Faltblätter werden durch drei intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert (Abb.1.3.). Sie verknüpfen je einen Cysteinrest aus dem Extrazellularloop E1 mit einem Cysteinrest des Extrazellularloop E2 eines Connexinmoleküls, wobei das erste Connexin des einen Loops mit dem dritten des anderen Loops verbunden ist.

Abb. 1.3.:

Cysteinbrückenbildung: Das Schema zeigt die drei Disulfidbrücken, die den Extrazellularloop E1 mit dem Extrazellularloop E2 eines Connexins verknüpfen. Das erste Connexin des einen Loops ist mit dem dritten des anderen Loops verknüpft. (nach Foote *et al.*, 1998)



1.4. Auflösungsgrenze des bisherigen Strukturmodells der GJ-Kanäle

Die extrazellulären sowie der cytosolische Loop der Connexine konnten in den aktuellen Arbeiten von Unger *et al.*, 1999 (a, b) nicht aufgelöst werden. So kann keine Zuordnung vorgenommen werden, welche der transmembranen Domänen den Kanalinnenraum auskleidet und welche mit dem Lipid der Zellmembran interagiert.

Ursache hierfür ist die Auflösungsgrenze in der Membranebene von 7.5 \AA sowie senkrecht dazu mit 21 \AA . Diese Auflösung ist nicht ausreichend, um die einzelnen Aminosäurereste einer Polypeptidkette identifizieren zu können. Somit können die den einzelnen transmembranen Domänen nicht die entsprechenden Polypeptidsequenzen des Cx43-Proteins zugeordnet werden. Es können auch keine Aussagen darüber gemacht werden, wo die postulierten α -helicalen Bereiche aus der Membran heraus- bzw. in die Membran hineintreten. Ebenfalls ist es nicht möglich, den Beginn oder das Ende einer α -helicalen Sekundärstruktur sowie den Übergang in eine β -Faltblattstruktur darzustellen. Der rotationssymmetrische Versatz zwischen den einzelnen Connexonen kann nicht eindeutig bestätigt werden. Es kann auch nicht geklärt werden, ob ein

Connexin des einen Connexons mit einem oder zwei Connexinen des gegenüberliegenden Connexons in Wechselwirkung tritt.

Zusätzlich konnte die gesamte C-terminale Domäne nicht berücksichtigt werden, da eine besser zu kristallisierende Cx43-Deletionsmutante untersucht wurde. Da Lysin 263 den neuen C-Terminus des rekombinanten Proteins darstellte, konnte fast ein Drittel des eigentlichen Wildtypproteins für die Strukturaufklärung nicht berücksichtigt werden.

1.5. Ursachen für die geringe Auflösung der Elektronen-Kryo-Mikroskopie

Die Elektronen-Kryo-Mikroskopie benötigt Proben, die in kristalliner Form vorliegen. 2D-Kristallisationen von Gap Junction Membrankanälen und anderen Membranproteinen werden üblicherweise durch die Rekonstitution erreicht. Dabei werden detergentsolubilisierter Lipide mit detergentsolubilisierter Proteinen gemischt. Anschließend wird das Detergenz durch Dialyse entfernt (Kühlbrandt, 1992; Jap *et al.*, 1992; Engel *et al.*, 1992).

Gap Junctions werden durch die native Aggregation hunderter Kanäle in Plaques gebildet und besitzen bereits eine kristalline Struktur. Diese Plaques lassen sich durch Zellfraktionierung und Zuckergradientenzentrifugation isolieren. Da das Protein bei diesem Ansatz niemals von seiner nativen Membranumgebung getrennt wird, wird dieses Vorgehen als *in situ* Kristallisation bezeichnet (Yeager, 1994; Yeager *et al.*, 1999). Durch eine Detergenzextraktion werden native Lipide entfernt, um eine Konzentration der Gap Junction Kanäle in der Membranebene und somit ein dichtgepacktes Gitter zu erreichen. Diese *in situ* Kristallisation liefert bisher die beste Auflösung, die jedoch durch die Reinheit der Kristalle begrenzt wird. Fremdproteine, die sich ebenfalls in den Gap Junctions befinden können oder zumindest mit ihnen isoliert werden, stören die kristalline Struktur der Probe. Die von Unger *et al.* (1999 b) für die Elektronen-Kryo-Mikroskopie aufgereinigten Gap Junction Plaques aus transfizierten BHK Zellen wiesen nach wie vor sehr große Verunreinigungen durch Nicht-Gap-Junction Proteine auf. Sie erreichten eine Reinheit, die der mit üblichen Membranpreparationen aus Lebergewebe vergleichbar war (Sikerwar and Unwin, 1988). Durch Behandlung der Probe mit DHPC konnten Membranbestandteile, die keine Gap Junction Proteine enthielten, teilweise gelöst werden. Jedoch zeigten SDS Gele der aufgereinigten und angereicherten Gap Junctions eine Vielzahl unterschiedlicher Banden, wobei durch eine Coomassie-Färbung der Gele keine dem rekombinanten Cx43 Protein entsprechende Bande sichtbar gemacht werden konnte.

Für die Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) muß die Probe nicht in kristalliner Form vorliegen. Auch solubilisierter Membranproteine, die zusätzlichen Aufreinigungsschritten unterzogen wurden und damit frei von Fremdproteinen sind, können ESR-spektroskopisch untersucht werden (Galla 1988).

1.6. ESR-Spektroskopie zur Aufklärung der Struktur und Funktion der Gap Junction Kanäle

Eine Aufreinigung von Gap Junctions zu zweidimensionalen Kristallen hoher Reinheit bereitet bisher außerordentliche Schwierigkeiten. Daher ist eine Röntgenstrukturanalyse der Gap Junction Kanäle, die strukturelle Information auf atomarer Ebene liefert, bisher nicht möglich.

Ein wenig gut aufgelöstes Modell der Struktur der Gap Junction Kanäle konnte aufgrund der beschriebenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen erstellt werden (Unger *et al.*, 1999a, b). Die geringe Auflösung von 7.5 Å in der Membranebene und 21 Å vertikal zur Membranebene bedingt jedoch, daß Aminosäureseitenketten nicht identifiziert werden können. Damit kann die Polypeptidsequenz nicht strukturellen Einheiten, wie sie beispielsweise die membranständigen Domänen darstellen, zugeordnet werden. Durch die Elektronenmikroskopie ist außerdem keine Information über die Dynamik der Gap Junction Kanäle während des Öffnen und Schließens der Kanäle zu gewinnen.

2D-NMR scheitert an der Unlöslichkeit der Gap Junction Kanäle in Wasser, die FTIR-Spektroskopie liefert bei Fragen der Strukturodynamik nur globale Backbonebewegungen.

Durch die ESR-Spektroskopie ist es möglich, Antworten auf die genannten Fragestellungen zu erhalten.

Die Leistungssättigungs-ESR-Spektroskopie liefert ein Maß für die Zugänglichkeit bestimmter Proteinpositionen durch paramagnetische Quencher wie z.B. O₂ (Altenbach *et al.* 1990). Quencher verbreitern bei einer Abnahme der Amplitude das ESR-Signal, sobald sie in die Nähe paramagnetischer Stellen gelangen. Aus der Zugänglichkeit bestimmter Proteinpositionen für den Quencher und der damit verbundene Änderung des ESR-Spektrums erhält man Aussagen über die Lage der Proteinpositionen. Beispielsweise kann mit Hilfe dieser Methode geklärt werden, ob sich eine bestimmte Aminosäure in der membranösen Lipidphase oder in der wäßrigen Phase befindet. Mit diesem Ansatz ist die Identifizierung einer α -helikalen Sekundärstruktur eines Connexins sowie die Lage dieser α -Helix bezüglich der membranösen Umgebung und der wassergefüllten Pore des Gap Junction Kanals möglich.

Durch die Tieftemperatur-ESR-Spektroskopie wird ein Einblick in die Polarität der Umgebung einer Proteinposition genommen (Steinhoff, 1988, Steinhoff *et al.*, 1999). Auch die Polarität ist ein Maß für die Lage einer Aminosäure im Protein. Werden Polaritätsänderungen während der Aktivität eines Proteins aufgezeichnet, so erhält man mit Hilfe dieses Parameters Einblicke in die funktionelle Beschaffenheit eines Proteins. Die Grundlage für den Mechanismus des Öffnen und Schließens eines Gap Junction Kanals könnte durch Polaritätsmessungen in der Umgebung der an diesem Prozess beteiligten Aminosäuren untersucht werden.

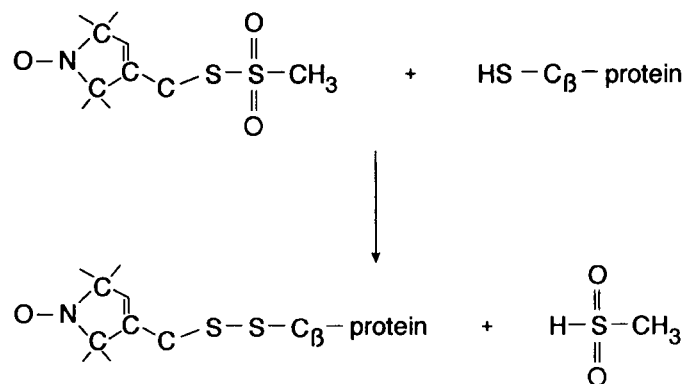
Mit Hilfe der Tieftemperatur-ESR-Spektroskopie kann der Abstand zwischen zwei nahe beieinanderliegenden spinmarkierten Aminosäuren gemessen werden. (Steinhoff *et al.*, 1997). Dies würde eine detaillierte Strukturaufklärung von Gap Junction Kanälen ermöglichen. So kann

beispielweise die Fragestellung der Anordnung der Connexine untereinander in einem Halbkanal oder auch die Lage zweier Halbkanäle zueinander in einem Gap Junction Kanal bearbeitet werden.

Zeitaufgelöste ESR-Spektroskopie ortsspezifisch spinmarkierter Proteine liefert als neuere Methode wichtige Hinweise zur Lösung von Struktur-Funktions-Problemen von Proteinen. (Steinhoff *et al.* 1994). Sie ermöglicht die orts- und zeitaufgelöste Detektion von Strukturänderungen, indem das durch Bewegungen des Proteins sich ändernde ESR-Signal verfolgt wird. So können nicht nur qualitative Aussagen über die Existenz von Strukturänderungen gemacht werden, sondern auch deren Verlauf als Funktion der Zeit wird nachgezeichnet. Für Gap Junction Kanäle wären strukturdynamische Untersuchungen des Mechanismus zum Öffnen und Schließen der Kanäle von großem Interesse.

Für diesen Mechanismus des Öffnens und des Schließens der Kanalpore wird das sogenannte „ball-and-chain“-Modell favorisiert. Morley *et al.* (1996) konnten zeigen, daß der C-Terminus des Cx43 für diesen Mechanismus verantwortlich ist. Ist der C-Terminus deletiert, zeigt sich der Gap Junction Kanal permanent geöffnet. Erst die zusätzliche Expression des nun frei im Cytosol diffundierenden C-Terminus erlaubt wieder das Schließen des Kanals. Ek *et al.* (1994) identifizierten den Histidinrest an Position 95 am Eingang der Kanalpore als essentiell für das Schließen des Kanals. Der C-Terminus könnte an diese Proteinposition reversible binden. Die dreidimensionale Struktur des C-Terminus ist dabei bisher unbekannt.

Abb. 1.4.:
Methanthiosulfonat-
„spinlabel“ (MTSSL) und
seine kovalente Bindung an
ein Cystein.



Alle Anwendungen der ESR-Spektroskopie auf die Gap Junction Kanäle erfahren durch die ortsspezifische Spinmarkierung eine große Bandbreite von interessanten Detektionsmöglichkeiten. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden wird an jeder beliebigen, zu untersuchenden Proteinstelle die Aminosäure eines Cx-Wildtyps gegen ein Cystein ausgetauscht. An diese Stelle bindet spezifisch ein als Spinsonde bezeichnetes paramagnetisches Nitroxidradikal wie das in dieser Arbeit verwendete Methanthiosulfonat aus Abb. 1.4.. Somit kann eine zur vorliegenden Fragestellung passende Connexinmutante gestaltet werden.

Ein Expressionssystem muß neben der Synthese einer ausreichenden Proteinmenge somit die Möglichkeit zur Expression ortsspezifisch mutagenisierter Connexine bieten. Da der das ESR-

Spektrum erzeugende Spinlabel kovalent an einen Cysteinrest bindet, müssen für interessierende Proteinbereiche wie beispielsweise eine postulierte transmembrane α -Helix Cysteinmutanten hergestellt werden. So kann eine ortsspezifische Spinmarkierung durchgeführt werden. Sukzessive werden einzelne, aufeinanderfolgende Aminosäurereste des Wildtypproteins durch Cysteinreste ersetzt (Steinhoff *et al.*, 1995), was als „Cysteinscreening“ bezeichnet wird. Aus der Gesamtheit der ESR-Spektren, die die einzelnen Spinlabel an den aufeinanderfolgenden Positionen im Protein verursachen, kann ein Bild der dreidimensionalen Struktur eines interessierenden Proteinbereichs entwickelt werden. Falls der Connexin-Wildtyp bereits durch seine nativen Cysteinreste Spinlabelmoleküle binden sollte, können entsprechende Wildtypkontrollen ESR-spektroskopisch vermessen werden. Diese Wildtypspektren können von dem Spektrum einer entsprechenden Cx-Cysteinmutante subtrahiert werden. Auf diesem Weg ist es möglich, das ESR-Spektrum zu ermitteln, das ausschließlich durch den Spinlabel am substituierten Cysteinrest verursacht wird.

1.7. Expressionssysteme

Eine der größten Herausforderungen auf dem Gebiet der Struktur- und Funktionsuntersuchung schwach expremierter integraler Membranproteine, die eine übergeordnete polymere Aggregation aufweisen, ist die Überexpression einer ausreichenden Menge funktionalen Proteins (Unger *et al.*, 1999 b). Für die elektrophysiologische Charakterisierung von Gap Junction Kanälen ist die Expression und die Bildung funktionaler Kanäle in unterschiedlichen Typen von Zellen möglich. So stellen Zellsysteme wie *Xenopus* Oozyten (Dahl *et al.*, 1987; Swenson *et al.*, 1989; Suchyna *et al.*, 1993; White *et al.*, 1995; Morley *et al.*, 1996; Oh *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 1998) oder transfizierte, kommunikationsdefiziente Zellen wie beispielsweise SKHep1 Zellen (Eghbali *et al.*, 1990; Fishman *et al.*, 1990, 1991; Moreno *et al.*, 1991a,b), HeLa Zellen (Traub *et al.*, 1994; Verselis *et al.*, 1994; Elfgang *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 1998) oder Mäuse-N2a-Neuroblastomazellen (Veenstral *et al.*, 1994, 1995; Beblo *et al.*, 1995; Brink *et al.*, 1997) etablierte Expressionssysteme für Gap Junction Kanäle dar. Sie nutzen das schwache Expressionsniveau der Connexine, da für die elektrophysiologische Untersuchung Einzelkanalereignisse bevorzugt werden. Eine große Zahl funktionaler Kanäle würde das eigentlich interessierende Einzelkanalereignis verdecken. Allerdings schließt das niedrige Expressionsniveau dieser Expressionssysteme eine biochemische Isolation und eine darauf aufbauende strukturelle Charakterisierung aus.

Connexine wurden in Sf9 Insektenzellen überexpremiert. Dies gelang durch eine Infektion mit einem rekombinanten Baculovirus (Stauffer *et al.*, 1991). Allerdings konnten keine 2D-Kristalle ausreichender Reinheit erzeugt werden, die für die Strukturuntersuchung durch die Elektron-Kryo-Kristallographie notwendig ist (Unger *et al.*, 1999 b).

Stabil transfizierte Baby Hamster Kidney (BHK) Zellen zeigen ebenfalls ein geringes Expressionsniveau (Kumar *et al.*, 1995). Durch eine Deletion des C-Terminus nach dem Lysin 263 der Cx43 cDNA aus dem Rattenherz konnten allerdings 2D-Kristalle von genügender Reinheit

erzeugt werden, sodaß die bereits beschriebenen Elektron-Kryo-Untersuchungen durchgeführt werden konnten (Unger *et al.*, 1999 a, b).

1.9. Probenreinheit und Erhalt der Funktionalität

Für die ortsspezifische Spinmarkierung und die anschließende ESR-Spektroskopie ist die Probenreinheit von großer Bedeutung. Da der eingesetzte Spinlabel an jeden frei zugänglichen Cysteinrest kovalent bindet, werden auch bei einer Verunreinigung der Probe durch Fremdproteine diese ebenfalls spinmarkiert. Diese spinmarkierten Fremdproteine tragen zum ESR-Spektrum bei.

Die Isolation funktionaler Cx-Kanäle kann auf unterschiedlichen Wegen erreicht werden. Da Cx-Membrankanäle sich zu Gap Junctions arrangieren, bietet sich die Zellfraktionierung und anschließende Zuckergradientenzentrifugation an. Diese Zellfraktionierung beinhaltet einen Extraktionsschritt, durch den Fremdproteine und native Membranlipide aus den Gap Junctions entfernt werden. Gebräuchlich sind zwei verschiedene Extraktionsverfahren. Das Detergenzextraktionsverfahren beruht auf der Zugabe ionischer Detergenzien zur bereits isolierten Membranfraktion (Goodenough and Stoeckenius, 1972). Die Gap Junction-Membrankanäle besitzen hierbei eine geringere Löslichkeit für diese Detergenzien als eine Vielzahl anderer Membranproteine und bleiben so in der Form eines zweidimensionalen Kristalls bestehen. Die Alkaliextraktion für Gap Junctions nutzt das Prinzip, daß integrale Membranproteine bei hohem pH nicht solubilisiert werden können (Steck, 1974, Hertzberg, 1984). Das Alkaliextraktionsverfahren beläßt die Cx-Membrankanäle ebenfalls in ihrer kristallinen Gap Junction Form. Beiden Verfahren ist jedoch gleich, daß die Gap Junctions weiterhin starke Verunreinigungen durch Fremdproteine beinhalten. Die bisher maximal mögliche Reinheit liegt bei $77 \% \pm 9 \%$ Gap Junction Proteinanteil an der Gesamtproteinmenge (Nicholson *et al.*, 1983; Cascio *et al.*, 1990). Bisher gelang es nicht, die beschriebenen Verfahren so zu verfeinern, daß zum einen die Gap Junctions als kristalline Ansammlung von Cx-Membrankanälen intakt bleiben, die Verunreinigungen aber effektive entfernt werden.

Für Elektronen-Kryo-Mikroskopische Untersuchungen ist die kristalline Struktur der Probe eine notwendige Voraussetzung, für die ESR-Spektroskopie hingegen nicht. Daher müssen für ESR-spektroskopische Untersuchungen keine intakten Gap Junctions isoliert werden. Einen geeigneten Isolationsweg stellt die Solubilisierung von einzelnen Membrankanälen oder Halbkanälen dar (Lampe *et al.*, 1991; Engel *et al.*, 1993; Kistler *et al.*, 1994; Rhee *et al.*, 1996). Durch Zugabe eines nicht ionischen Detergenzes werden die Kanäle als ganzes oder in Form von Halbkanälen aus ihrer Membranumgebung herausgelöst. Sie befinden sich eingehüllt von Detergenzmolekülen gelöst in der wässrigen Phase. Dieser Isolationsweg bietet den großen Vorteil durch chromatographische Verfahren eine weitere Aufreinigung zu erreichen.

1.10. Zielsetzung

Aufgabe dieser Arbeit war die Etablierung eines Überexpressionssystems für Connexine, um ausreichende Cx-Proteinmengen für die ESR-Spektroskopie zu gewährleisten. Das für die Strukturaufklärung mittels ESR-Spektroskopie notwendige Cysteinscreening sollte im Bereich der dritten membranständigen Domäne beginnen. Mit diesem Ansatz sollte geklärt werden, ob diese Domäne mit der wassergefüllten Pore in Kontakt ist. Hierzu mußten ortspezifische Cystein-Mutationen herbeigeführt werden, die für die ortspezifische Spinmarkierung benötigt werden.

Im Anschluß an die Etablierung eines Expressionssystems war eine geeignete Isolationsmethode zu erarbeiten, die die für die ESR-Spektroskopie benötigte Reinheit gewährleisten würde. ESR-Spektren sollten nun klären, ob die Cysteine des Wildtyp-Connexins für den Spinlabel zugänglich waren, um anschließend mit der Strukturaufklärung der dritten membranständigen Domäne zu beginnen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Enzyme

Agarose	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bacteriological Pepton	Oxod, Wesel
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Complete Proteasehemmer	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Desoxyribonukleotide	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
DNA modifizierende Enzyme	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
	Gibco BRL, Berlin
DTT	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Ethidiumbromid	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
8-GLU (n-Octyl- β -D-glucopyranoside, OG)	Bachem, Heidelberg
MTSSL (1-oxy-2,2,5,5-Tetramethylpyrrolin-3-methyl-methanthiosulfonat)	Reanal, Budapest HU
Oligonukleotide	MWG-Biotech GmbH, Ebersberg
8-POE (n-Octyl-Polyoxyethylen, n-Octyl-POE, Rosenbusch-Tenside)	Bachem, Heidelberg
Proteingrößenmarker für SDS-PAGE	BioRad, München
Superose 6pg (prep grade)	Pharmacia, Erlangen
³⁵ S-Methionin	ICN, München
Detergenzien	Bachem, Heidelberg
	Calbiochem, Bad Soden
Insektenzellenkulturbedarf	Invitrogen, Groningen NL
Antikörper	Zytomed, Berlin
	Invitrogen, Groningen NL
	O. Traub, Institut für Genetik, Universität Bonn

Nicht gesondert aufgeführte Reagenzien wurden in den jeweils höchsten erhältlichen Reinheitsstufen eingesetzt und aus dem örtlichen Chemielager oder von den Firmen Bio-Rad, Merck, Fluka, Serva oder Sigma bezogen.

2.1.2. Sonstige Materialien

Sterilfilter, 0.22 µm,	Schleicher & Schuell
Qiagen-Kits	Qiagen, Hilden
MicroBCA Pierce	KMF, Sankt Augustin

2.1.3. Bakterienstämme

E.coli XL1 Blue (Bullock *et al.*, 1987)

Genotyp: *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA46*, *thi*, *relA1*, Tn10(*tet*^r), *lac*⁻,
F' [*proAB*⁺, *lac*^q, *lacZ*ΔM15]

2.1.4. Zelllinien

HeLa	ATCC CCL2, Hülser und Webb, 1973, humane Zervixkarzinomzelllinie
High Five	BTI-TN-5B1-4, Granados <i>et al.</i> , 1994, Ovarzellen des Kohlweisweißlings

2.1.5. Plasmide

siehe Anhang 6.1.

2.1.6. Medien

2.1.6.1. Nährmedien

Nährmedium für E. coli: LB-Medium

10 g	Bacto-Trypton
5 g	Hefe-Extrakt
10 g	NaCl

ad 1 l H₂O

Agarplatten: Für Agarplatten wurden 15 g Bacto-Agar pro Liter Medium zugesetzt.

2.1.6.2. Zellkulturmedien

HeLa

	DMEM
10 %	Fötales Kälberserum (FCS)
0,17 %	Glutamin
100 units/ml	Penicillin
0,1 mg/ml	Streptomycin

High Five

	High Five Serum Free Medium
0,5 x	PSN
0,2 %	Pluronic (nur für Schüttelkulturen)

Schüttelkulturen wurden in Erlenmeyerkolben angesetzt.

2.1.7. Antibiotikazusätze zu den Medien (pro ml)

50 µg	Ampicillin
12.5 µg	Tetracyclin
50 µg	Zeocin

2.1.8. Antikörper

mk Anti-V5-HRP	Invitrogen, Groningen NL, erkanntes Epitop: Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr
Rabbit pk Anti Cx46	O. Traub, Universität Bonn
FITC-Anti Rabbit	Dako, Hamburg

Die von den Antikörpern erkannten Epitope wurden auf gezielte Nachfrage nicht bekannt gegeben.

2.1.9. Puffer und Lösungen

Laufpuffer für Gelfiltration:

300 mM	NaCl
50 mM	Natriumphosphat
	pH 8.00
1 %	Detergenz in Abhängigkeit von der Aufgabenstellung

Homogenisierungspuffer

1 x	Complete Proteasehemmer
50 mM	Natriumphosphat
	pH 8.00

Solubilisierungspuffer:

1 x Complete	
Proteasehemmer	
1 % (v/v)	8-POE
50 mM	Natriumphosphat
	pH 8.00

TE-Puffer:

10 mM	Tris/HCl pH 8.0
1 mM	EDTA

TBE-Elektrophorese-Puffer:

90 mM	Tris-Borat
2 mM	EDTA
	pH 8,0

DNA-Probenpuffer:

50 %	Saccharose
100 mM	EDTA
0.1 % (v/v)	Bromphenolblau, pH 7.0
0.1 % (w/w)	SDS

Dichtegradientenpuffer

150 mM	NaCl
50 mM	Tris
	pH 7,6

TNT-Waschpuffer

50 mM	Tris
1 M	NaCl
	pH 6,8

TNT-Markierungspuffer

50 mM	Tris
1 M	NaCl
10 mM	CaCl ₂
	pH 6,8

Transferpuffer:

25 mM	Tris
200 mM	Glycin
20 %	Methanol

ESR-Puffer:

14.06 g	Dinatriumhydrogenphosphat·2H ₂ O
2.90 g	Natriumdihydrogenphosphat·1H ₂ O
5.84 g	NaCl

ad 1 l H₂O

Ni-NTA-Affinitätschromatographie-Puffer:

50 mM	NaP _i
300 mM	NaCl
1 % (v/v)	8-POE
1x	complete Proteasehemmer
0 mM	Imidazol für Äquilibrationpuffer
20 mM	Imidazol für Waschpuffer
500 mM	Imidazol für Standardelutionspuffer
200 mM	EDTA für EDTA-Elutionspuffer

Silberfärbungs-Fixierer

500 ml	Methanol
100 ml	Essigsäure
400 ml	H ₂ O

Silberfärbungs-Entfärbelösung

5 %	Methanol
7,5 %	Essigsäure
87,5 %	H ₂ O

Silberfärbungs-Entwickler

30 g	Natriumcarbonat
0,5 ml	37 % Formaldehyd
ad 1 l	H ₂ O

2.1.10. Oligonucleotide

Mutageneseprimer:

NheI sense	5'- GGT TAG CAG TCG CTA GCA ATG GGC GAC - 3'
NheI anti	5'- GTC GCC CAT TGC TAG CGA CTG CTA ACC - 3'
5-SpeIpPH4rCx43sense	5'- CGG CTT CAC TTT CAA CTA GTG AAA GAG AGG TGC - 3'
3-SacIIpPH4rCx43anti	5'- CAG GTC ATC AGG CCG CGG CCT GCT GCT GGC GCG - 3'
Xba1A	5'- TAT TTT ACT GTT TTC TAG ACA GTT TTG TAA TAA - 3'
KpnI	5'- AAC TCC TTT ACT TTG GGT ACC AGG GAA ACT TCA - 3'
M1K146Csense	5'- GAG CAC GGC AAG GTG <u>TGC</u> ATG AGG GGC GGC TTG - 3'
M1K146Cantisense	5'- CAA GCC GCC CCT CAT <u>GCA</u> CAC CTT GCC GTC CTC - 3'
M2R148Csense	5'- GGC AAG GTG AAA ATG <u>TGC</u> GGC GGC TTG CTG AGA - 3'
M2R148antisense	5'- TCT CAG CAA GCC GCC <u>GCA</u> CAT TTT CAC CTT GCC - 3'

Unterstrichen ist das Triplett für die geänderte Aminosäure, kursiv die ausgetauschten Basen.

Primer für Klonierungen:

Hind5	5'- ATG GAA TTC GAA GCT TTC TTG CTT - 3'
Sal3	5'- GAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC AGC - 3'
Orient5	5'- ACC AAC CAC TTC AAC CCA GAT GCC - 3'
Tniero3	5'- GGC ATC TGG GTT GAA GTG GTT GGT - 3'

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

Grundlegende molekularbiologische Methoden wie Agarose-Gelelektrophorese, Restriktion, Ligation, Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten, Auffüllreaktion, DNA-Fällung und Transformation von Bakterien wurden nach Sambrook *et al.* (1989) oder modifiziert nach den Vorschriften der Enzym-Hersteller durchgeführt.

2.2.1.1. Mutagenese durch PCR-Overlap-Extension

Der ortsspezifische Austausch von Basen in der für das Cx43 der Ratte codierenden cDNA wurde mittels Mutagenese durch PCR-Overlap-Extension durchgeführt. Hierzu wurde ein erster PCR-Ansatz mit zwei Proben hergestellt: 20 ng pPH4, 100 pmol Mutageneseprimer (sense), 100 pmol Globalprimer (antisense), oder 100 pmol Mutageneseprimer (antisense) und 100 pmol Globalprimer (sense), sowie 2.5 U Pwo-Polymerase, 2 µl einer 10 mM dNTP-Mischung (jedes dNTP war 2.5 mM konzentriert), 10 µl 10 x Pwo-Polymerasepuffer, ad 100 µl steriles Adest. Der Ansatz wurde mit 50 µl sterilem Paraffin überschichtet und 30 PCR-Temperaturzyklen unterzogen:

	Denaturierung		Hybridisierung		Polymerisation	
	T/° C	t/min	T/° C	t/min	T/° C	t/min
Startzyklus	96	3	65 ± 5	1	72	1
weitere Zyklen	94	1	65 ± 5	1	72	1

Ein Endschriff von 10 min bei 72°C wurde angeschlossen. Die Hybridisierungstemperatur lag einige Grad unter der abgeschätzten Schmelztemperatur eines jeden Mutageneseprimers, mußte allerdings bei Fehlhybridisierungen korrigiert werden.

Nach Aufreinigung von 50 µl der PCR-Produkte in einem Agarosegel wurde ein zweiter PCR-Schritt durchgeführt: je 1/10 der DNA-Menge aus der vorherigen Aufreinigung (ca. 100 ng) wurden vereinigt und mit 100 pmol je Globalprimer zu einem PCR zusammengeführt. Die Temperaturzyklen entsprachen denen im ersten Mutageneseschritt.

2.2.1.2. Mini- und Maxipräparation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Kits der Firma Qiagen durchgeführt.

2.2.1.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Unter Verwendung des Quiaex-Kit wurden DNA-Fragmente aus Agarosegelen isoliert.

2.2.1.4. Konzentrationsbestimmung von DNA

Mittels optischer Spektroskopie wurde die OD bei 260 nm der in einer Quarzküvette mit TE verdünnte DNA bestimmt. Die DNA-Konzentration wurde wie folgt berechnet:

$$[\text{DNA}] = 50 \mu\text{g/ml} \cdot \text{OD}_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}.$$

2.2.1.5. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde im Institut für Humangenetik der Universität-Gesamthochschule Essen durchgeführt.

2.2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1. Lagerung von Bakterien

E. coli-Stämme wurden in Form von Glycerinkulturen gelagert. Hierzu wurden 0.7 ml einer stationären Flüssigkultur mit 1 ml sterilem Glycerin gut durchmischt und bei -20 °C aufbewahrt. Agarplatten-Kulturen wurden bei 4°C für mehrere Wochen aufbewahrt.

2.2.2.2. Anzucht von Bakterienkulturen

E. coli-Kulturen: Angeimpfte Flüssigkulturen wurden ggf. unter Beachtung der entsprechenden Resistenz über Nacht bei 37 °C und 100-300 U/min in einem Inkubationsschüttler in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben angezogen.

Auf Agar-Platten wurden mit einer sterilen Impföse Bakterien aus Flüssigkulturen ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.2.3. Herstellung transformationskompetenter *E.coli*

500 ml LB-Medium wurden mit 0.5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₅₇₈ von 0.5 in einem Schüttler (Minimum 200 Upm) inkubiert. Die in einem Wasser-Eis-Bad gekühlten Zellen wurden abzentrifugiert (6000 g, 4 °C, 10 min), der Überstand dekantiert und die restliche Flüssigkeit vorsichtig abpipettiert. Das Sediment wurde zweimal in 250 ml 10 % (w/v) eisgekühltem Glycerin resuspendiert und unter obigen Bedingungen nochmals zentrifugiert. In 50 ml eisgekühltem Glycerin wurde das Pellet erneut gelöst und für 10 min mit 8000 g bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml 10 % (w/v) eisgekühltem Glycerin resuspendiert, zu je 40 µl in Eppendorfgefäße portioniert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bei -80 °C mehrere Wochen gelagert.

2.2.2.4. Transformation kompetenter *E. coli* durch Elektroporation

40 µl kompetenter *E. coli* in einer 0.2 cm breiten Elektroporationsküvette wurden 1 bis 10 ng zu transformierender DNA, die sich in einer Lösung geringer Ionenstärke (z.B. 10 % (w/v) Glycerin) befand, zugegeben. Die Elektroporation wurden mit Hilfe eines BioRad Genepulser (200 Ohm, 25

μF , 2.5 kV) durchgeführt, wobei eine Zeitkonstante für den Abfall des elektrischen Feldes von 4.7 μs erreicht werden mußte. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort mit 1 ml LB-Medium überschichtet, in Eppendorfgefäße überführt und eine Stunde bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. 200 μl wurden ausgestrichen, während das restliche Volumen abzentrifugiert (1 min, 12000 g, RT), der Überstand dekantiert und das Pellet in 220 μl 10 % (w/v) Glycerin (RT) resuspendiert. 200 μl wurden auf selektiven Platten ausgestrichen.

2.2.3. Zellen und Zellkultur

2.2.3.1. Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung von Insektenzellen ist in folgender Literatur hinreichend beschrieben: King and Possee, 1992, sowie O'Reilly *et al.*, 1992. Zusätzlich sind sehr detaillierte Protokolle der Herstellerfirmen im Internet erhältlich (z.B. www.invitrogen.com).

Standardmethoden zur Kultur von HeLa-Zellen sind bei Roth, 1994, zu finden. Im folgenden sollen die Abweichungen von Standardmethoden angegeben werden.

2.2.3.2. Transiente Transfektion von HeLa-Zellen

Es wurde das LipfectAmine-System von Gibco verwandt, das Liposomen zum DNA-Transfer benutzt. Die Angaben im Herstellerprotokoll wurden befolgt, wobei serumreduziertes OptiMEM Kulturmedium eingesetzt wurde.

Für HeLa-Zellen zeigte sich die größte Transfektionseffizienz für folgende Parameter:

2 μg DNA werden mit OptiMEM zu 100 μl Endvolumen aufgefüllt, 6 μl Lipofectamin werden in 94 μl OptiMEM gegeben, beide Ansätze werden zusammengegeben, für 10 s durch intensives Schütteln gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 800 μl OptiMEM werden PBS gewaschene 70 % konfluente Zellen in einer 6 Well Platte mit 1 ml dieses Transfektionsansatzes überschichtet. Nach 5 h bei 37°C im Zellkulturbrutschrank wird 1 ml HeLa-Medium (mit 20 % FCS) zum Transfektionsansatz gegeben. 24 h nach Beginn der Transfektion werden die Zellen passagiert.

2.2.3.3. Stabile Transfektion von HeLa-Zellen

Nach Befolgen des Protokolls für die transiente Transfektion von HeLa-Zellen werden die Zellen einem Selektionsdruck ausgesetzt. In einem „Kill-curve-Versuch“ konnte die lethale Hygromycin-Endkonzentration zu 100 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt werden. Transfizierte Zellen wurden daher 48 h nach der Beginn der Transfektion einem Hygromycin-Selektionsdruck von 200 $\mu\text{g/ml}$ für 7 d ausgesetzt. Die Zellen wurden nun mit HeLa-Medium (50 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin) überdeckt und die folgenden Tage auf die Bildung von Zellhaufen mit mehr als 100 Zellen überprüft. Entsprechende Zellhaufen wurden nach Aufsetzen eines einseitig mit Vaseline überzogenen Metallzylinders trypsiniert und in

24-Well-Kulturplatten überführt. Die Zellen wurden weiterhin mit HeLa-Medium (50 µg/ml) gehalten.

2.2.3.4. *Baculovirus vermittelte Transfektion von Insektenzellen*

Die Baculovirus vermittelte Transfektion von Sf9 Insektenzellen wurde anhand das Protokoll der Firma Invitrogen (www.invitrogen.com/manuals/index.html) unter Verwendung insektenzellspezifischer Liposomen (InsectinPlus, Invitrogen) befolgt.

2.2.3.5. *Transiente Transfektion von Insektenzellen*

Für die transiente Transfektion von High Five Insektenzellen wurde das Protokoll der Firma Invitrogen (www.invitrogen.com/manuals/index.html) unter Verwendung insektenzellspezifischer Liposomen (InsectinPlus, Invitrogen) befolgt.

2.2.3.6. *Stabile Transfektion von Insektenzellen*

Die stabile Transfektion von Insektenzellen erfolgte ebenfalls nach dem Protokoll der Firma Invitrogen (www.invitrogen.com/manuals/index.html). Abweichend von diesem Protokoll wurden die Zellen für die Selektion in Zeocin 48 h nach der Transfektion für 5 d einem Selektionsdruck von 800 µg/ml ausgesetzt, der dann nochmals auf 1200 µg/ml für weitere 5 d erhöht wurde. Stabil transfizierte Zellen wurden bei 50 µg/ml Zeocinendkonzentration gehalten. Nach 14-21d wurde ein Teil der stabil transfizierten Zellen erneut für 5 d einem Zeocin-Selektionsdruck von 1200 µg/ml ausgesetzt, was zu einer deutlichen Steigerung der Expression des GFP führte, für das der Transfektionsvektor pIZTV5His ebenfalls codiert.

2.2.3.7. *Immunhistochemie*

Das Protokoll wurde in Anlehnung an Colley *et al.* (1992) durchgeführt. Der Zellrasen einer semikonfluenten T75-Zellkulturflasche wurde mit einem Zellschaber vorsichtig gelöst. $2 \cdot 10^6$ Zellen wurden verdünnt auf Deckgläsern ($r = 6 \text{ mm}$) in 6 Well Zellkulturplatten ausgesät. 24 h später wurden die Objektträger einmal mit PBS gewaschen, mit einer 1:1 Methanol/Aceton Mischung für 5 min fixiert, 2 x mit PBS für 5 min gewaschen und anschließend mit PBS/BSA (0,5 g BSA pro 100 ml PBS) für 10 min gewaschen. Der Primärantikörper wurde in der ebengenannten PBS/BSA-Lösung nach Angaben des Herstellers verdünnt und 20 µl des verdünnten Antikörpers auf jedes Deckgläschen gegeben. Dieser Ansatz inkubierte für 1,5 h bei 4°C, um anschließend für 1x10 min und 2 x 5 min mit PBS/BSA gewaschen zu werden. Der zweite Antikörper wird nach Angaben des Herstellers in PBS/BSA verdünnt, 20 µl der Lösung werden auf jedes Deckgläschen gegeben. Der Ansatz wurde lichtdicht in eine Aluminiumfolie gewickelt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1x10 min und 2 x 5 min mit PBS/BSA gewaschen. Nachdem kurz mit Aqua Bidest. gewaschen wurde, mußte das überschüssiges Wasser abtropfen. Proben mit FITC konjugiertem 2. Antikörper wurden mit VectaShield eingedeckelt. Im

Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot mit Auflichtfluoreszenz) wird FITC bei einer Wellenlänge zwischen $\lambda = 450\text{-}490$ angeregt und bei einer Wellenlänge von $\lambda = 515\text{-}565$ nm ausgewertet. Bei HRP konjugiertem 2. Antikörper, wurde der Objektträger mit DAB-Färbelösung (1:50 verdünnte DAB-Stocklösung von DAKO in PBS/BSA) für 5 min inkubiert. Anschließend wurde nochmals mit Aqua Bidest. gewaschen, das überschüssige Wasser abgetropft und mit VectaShield eingedeckelt.

2.2.4. Biochemische Methoden

2.2.4.1. *In vitro* Transkription und Translation

Die *in vitro* Transkription und Translation wurde in einem gekoppelten System durchgeführt. Hierzu wurde der Kit „TNT SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System“ der Firma Promega unter Verwendung mikrosomaler Membranen aus Hundepankreas (Promega) entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Die Proben wurden nach Abschluß der *in vitro* Transkription und Translation mit dem 100fachen Volumen des TNT-Ansatzes mit TNT-Waschpuffer gewaschen (15°C , 100000 g, 30 min). Das Cx-haltige Membranpellet wird in 500 μl entgastem TNT-Markierungspuffer (enthält Ca^{2+} -Ionen zum Schließen der Halbkanaäle) gelöst. Nach Zugabe von 1 μl einer 500 mM MTSSL-Stocklösung (in Acetonitril gelöst) wird der Ansatz 20 min unter einer Argonatmosphäre inkubiert. Die spinmarkierten membranständigen Connexone werden viermal gewaschen: Resuspendierung in 25 ml TNT-Markierungspuffer, 15°C , 30 min, 100000 g. Die Membranen werden in 10 μl TNT-Markierungspuffer resuspendiert.

2.2.4.2. Dichtegradientenzentrifugation

Nach dem Protokoll von Falk *et al.* (1997) wurde wie folgt vorgegangen: Mikrosomen eines 250 μl -TNT-Ansatzes, die *in vitro* –synthetisierte ^{35}S -Methionin markierte Connexine enthalten werden zweimal mit 25 ml TNT-Waschpuffer zentrifugiert (15°C , 30 min, 100000 g), um anschließend in 1 % Triton X-100 für 30 min bei 4°C solubilisiert zu werden. Die ungelösten Membranbestandteile werden bei 15°C , 30 min und 100000 g abzentrifugiert, der Überstand wird auf 5 ml eines 5-20 % Saccharose-Zuckergradienten, der in Dichtegradientenpuffer mit 1 % Triton X-100 gelöst ist, gegeben. Nach einer Zentrifugation von 16 h, 4°C , 180000 g im Swing-Out-Rotor wurden 200 μl Aliquots mit abgeschnittenen 1000 μl Kunststoffpipettenspitzen abgenommen. 25 μl eines jeden Aliquots wurden im Szintillationszähler analysiert. Die Fraktion mit der geringsten Aktivität wurde als Hintergrund von allen übrigen Fraktionen subtrahiert. Die Fraktion mit der größten Aktivität wurde als 100 % Marke gesetzt, die Aktivitäten aller anderen Fraktionen wurden relativ zu diesen 100 % berechnet.

2.2.4.3. Isolation von Connexinproteinen

2.2.4.3.1. Theorie zur Solubilisierung von Membranproteinen

Bei Detergenzien handelt es sich um Tenside, Moleküle mit einem starken amphiphilen Charakter. Tenside sind in der Regel in der wäßrigen Phase gelöst. Sie bestehen aus einem stark hydrophilen und einem stark hydrophoben Molekülteil. Diese Verbindungen werden nach der Natur der hydrophilen Kopfgruppe in anionische, kationische, zwitterionische (d.h. starke Elektrolyte mit vollständiger intramolekularer Ladungskompensation) und nichtionische Tenside eingeteilt. Die hochaktiven Tenside reichern sich stark an der Oberfläche ihrer wäßrigen Lösungen (bzw. in deren Grenzflächen zu einer Kohlenwasserstoff-(Öl)-Phase) an und erniedrigen die Oberflächenspannung des Wassers stark. Neben diesem Gleichgewicht zwischen gelöstem und oberflächen gebundenem Tensid tritt mit zunehmender Konzentration an Tensid das Phänomen der Mizellbildung auf. Wenn die Lösungsoberfläche mit einer Monoschicht von orientierten Tensidmolekülen besetzt ist, so wird ihre weitere, energetisch begünstigte Einlagerung in der Grenzfläche praktisch unmöglich. Ab einer relativ scharfen Konzentration, der kritischen Mizellkonzentration (CMC, engl.: critical micelle concentration), bilden die Tensidmoleküle Mizellen, das heißt Assoziate von typischerweise 50-200 Molekülen. Dabei weisen die hydrophoben Molekülteile ins Lumen der Mizelle, während die hydrophilen Molekülteile in die wäßrige Lösung eintauchen. Mit der energetisch relativ günstigen Anordnung kann eine erhebliche Menge der an sich sehr schlecht löslichen Tensidmoleküle in der wäßrigen Phase untergebracht werden.

Die Kleinheit der Oberflächenspannung der Tensidlösung erleichtert die Vergrößerung der Oberfläche bei mechanischer Agitation. Dies wiederum führt zu erleichterter Schaumbildung.

Die Anwendung von Tensiden als Detergentien beruht auf der Wechselwirkung der hydrophoben Molekülteile des Tensids mit Kohlenwasserstoffverbindungen. Das Auftreten von Mizellen oberhalb der CMC gibt Anlaß zum Phänomen der Solubilisierung von kleinen hydrophoben Molekülen im Inneren der Mizelle.

Zur Solubilisierung von Membranproteinen unter nicht denaturierenden Bedingungen sind die zwitterionischen und mehr noch die nichtionischen Tenside viel besser geeignet als die anionischen Tenside. Man setzt sie hierbei meist bei Konzentrationen ein, die oberhalb der CMC liegen (Adam *et al.*, 1988; Hiemenz, 1986; Hunter, 1987).

2.2.4.3.2. Solubilisierung von Cx-Halbkanälen aus transfizierten High Five Insektenzellen

In einem 500 ml Erlenmeyerkolben wurde eine Schüttelkultur mit 60 ml Medium und einer Anfangskonzentration von $0.5 \cdot 10^5$ Zellen/ml hergestellt. Nach 48 h mußte die Vitalität der Zellen durch einen Trypan-Blau-Test sowie die Zellendkonzentration der Schüttelkultur mittels einer Neubauerzählkammer festgestellt werden. Sie sollte zwischen 4 und $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml liegen. Die Zellen wurden bei 600 g, RT, für 5 min abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden mit Moscona bei RT gewaschen, und unter vorherigen Bedingungen nochmals zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Homogenisierungspuffer aufgenommen und im Dounce-Homogenisator mit 20 Hüben homogenisiert. Mit einem Trypan-Blau-Test wurde unter dem

Phasenkontrastmikroskop der Zustand der Zellen überprüft. Die Proben wurden anschließend auf Eis mit einem Minipistil-Homogenisator bei 5000 U/min 10 s behandelt, eine 30 s Pause eingelegt und anschließend nochmals 10 s behandelt. Mittels eines Trypan-Blau-Tests wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop der Zustand der Zellen überprüft. Da verschiedene Homogenisierer zu unterschiedlichen Zell-Aufbruch-Ergebnissen führen können, mußte die Homogenisierung im Phasen-Kontrast-Mikroskop kontrolliert werden. Der Zell-Aufbruch wurde anhand der Relation von intakten Zellen zu freien Nuclei abgeschätzt, wobei eine Zell-Aufbruch-Quote von 99 % erreicht werden mußte. Exzessive Homogenisierung führt allerdings zu geringen Ausbeuten (Hertzberg, 1983). Das Pellet des erneut zentrifugierten Homogenisats (11000g, 4°C, 30 min) wird als Rohmembranfraktion bezeichnet, das Membranfeuchtgewicht wurde durch Wägen bestimmt. Dieses Pellet wurde in 600 µl Solubilisierungspuffer mit einer 1000 µl 1 x Pipettenspitze so resuspendiert, daß es nicht zur Schaumbildung kommt. Die Probe wurde bei RT stengelassen. Der Zeitraum vom Beginn des Resuspendierens bis zum nächsten Zentrifugationsschritt (30 min, 4°C, 45000g) mußte 5 min betragen. Der Überstand enthielt solubilisierete Halbkanäle und wurde abgenommen und auf Eis (0°C) im Kühlraum aufbewahrt.

2.2.4.4. Dialyse kleiner Volumina zur Aggregation von Halbkanälen

Das „crude assembly“-Protokoll von Kistler *et al.* (1994) wurde leicht modifiziert. Ein Eppendorfgefäß wurde in Höhe der 1 ml Marke durchgesägt, anschließend der Deckel mit dem daranhängenden Rest des Gefäßes autoklaviert. Ein Dialyseschlauch wurde in 2x2 cm Quadrate zerschnitten, und zur Aktivierung 30 sec in Aqua dest. gekocht. Da Dialyseschläuche schwermetallhaltig sind, mußte mit Handschuhen gearbeitet werden. 200 µl der zu dialysierenden Flüssigkeit wurden in den Deckel des Eppendorfgefäßes pipettiert. Das quadratische Stück Dialysemembran wurde auf den Ring der inneren Deckelseite gelegt, der Rest des Eppendorfgefäßes so darüber gestülpen, daß keine Undichtigkeiten auftraten. Der Ansatz wurde bei 4°C auf einem Rührgerät 24 h gegen 1 l eines Austauschpuffers dialysieren. Der Austauschpuffer wurde alle 8 h gewechselt. Mittels einer Insulinspritze und einer Injektionsnadel wurde die Flüssigkeit nach Beendigung der Dialyse abgezogen.

2.2.4.5. Gelfiltration Superose 6 PG mit Eichung

Eine Superose 6 PG Säule wurde mit den folgenden Standards geeicht: Kinase (1200 kd), Thyreoglobulin (668 kd), Ferritin (440 kd), Aldolase (158 kd), α -Amylase (200 kd), Katalase (232 kd), IgG (150 kd), Ovalbumin (45 kd), Chymotrypsinogen (25 kd), Trypsininhibitor (20 kd), Cytochrom c (12,4 kd), Ubiquitin (8,5 kd). 500 µl dialysierter oder detergenzbehandelter Connexine wurden auf die Säule aufgetragen und im Eluat durch eine Dot Blot Densiometrie quantitativ nachgewiesen. Die Flußrate betrug 8 ml/h, das Fraktionsvolumen 1 ml. Der Kapazitätsfaktor k' ist als $(V_e - V_o)/V_o$ definiert, wobei V_e das Elutionsvolumen und V_o das

Ausflußvolumen darstellen. V_o entspricht dem Elutionsvolumen des Dextranblau (2000 kd). Die Säule wurde mit dem dreifachen Säulenvolumen an Laufpuffer ohne Detergenz gewaschen.

2.2.4.6. Proteinkonzentrationsbestimmungen

Der MicroBCA-Proteinbestimmungsassay von PIERCE (KMF, Sankt Augustin) liefert eine Empfindlichkeit von minimal 0.5 µg/ml. Es wurde nach den Angaben des Hersteller vorgegangen.

2.2.4.7. Ni-NTA-Affinitätschromatographie

In eine Biorad-Säule wurden 250 µl Ni-NTA Matrix (Qiagen) gegeben und diese mit dem 20fachen Säulenvolumen Äquilibrationpuffer eingestellt. Die Matrix wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde appliziert und für 2 h bei 4°C mit der Matrix unter leichtem Schütteln inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde wieder in die Biorad-Säule überführt und mit dem 20fachen Säulenvolumen gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem Säulenvolumen imidazolhaltigem Elutionspuffer.

2.2.4.8. Dot Blot Densiometrie

Belichtete Filme wurden mittels eines Durchlichtscanners digitalisiert. Die Schwärzung der einzelnen Dots, die proportional zur Konzentration des interessierenden Proteins ist, wurde durch eine Bildbearbeitungssoftware bestimmt. Das Flächenintegral der Schwärzung eines Dots wurde durch das Produkt aus der Anzahl der Pixel pro Dot mit dem Mittelwert der Schwarztöne (Photoshop: Menü Bild, Menüpunkt Histogramm) genähert.

2.2.4.9. Elektrophorese von Proteinen

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde nach Laemli (1970) durchgeführt.

2.2.4.10. Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel in 100 ml Silberfärbungs-Fixierer für 30 Minuten langsam geschüttelt. Nach dem Abgießen des Fixierers wurde das Gel in 100 ml Silberfärbungs-Entfärbelösung für 30 min geschüttelt. Nun wurde das Gel in einer 10% (v/v) Glutaraldehydhyd (in A.dest.) für 10 bis 15 min unter dem Abzug geschüttelt. Anschließend wurde das Gel für 2 h in A.dest. gewaschen, wobei das Wasser fünfmal gewechselt wurde. Darauf folgte eine Schüttelinkubation in 100 ml DTT-Lösung (5 mg/l in H₂O). Ohne das Gel zu spülen, wurde es in 100 ml Silbernitratlösung für 30 min langsam geschüttelt. Anschließend wurde das Gel kurz in H₂O gewaschen und zweimal mit der Silberfärbung-Entwicklerlösung gespült. Nun wurde das Gel in 100 ml Entwickler langsam geschüttelt, bis die Banden gut sichtbar waren. Die Entwicklung wurde durch Zugabe von 5 ml Stopplösung (2,3 M Zitronensäure) gestoppt und das Gel nach 10 min in H₂O überführt.

2.2.4.11. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Der Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen erfolgte mit Western Blot Kammern der Firma Biometra (München). Einen Schwamm, drei Lagen Whatman 3MM Filterpapier, die Nitrozellulosemembran, das Polyacrylamid-Gel mit den elektrophoretisch getrennten Proteinen, drei weitere Lagen Whatman 3MM Filterpapier und ein Schwamm, jeweils in Transferpuffer (4°C) getränkt, wurden luftblasenfrei zu einem Blot in den dafür vorgesehenen Rahmen gespannt. Nach Einsetzen des Rahmens in die Blotapparatur erfolgte der Transfer für 2 h auf Eis bei 2,5 mA/cm² Gelfläche.

2.2.4.12. Dot Blot

Je 1 µl jeder Probe wird auf eine Nitrozellulosemembran pipetiert. Ist der Probenpunkt trocken, wird sofort mit dem Chemolumineszenzverfahren begonnen.

2.2.4.13. Chemolumineszenz

Zum Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen, werden diese Proteine von spezifischen Primärantikörpern detektiert. Diese spezifischen Antikörper sind entweder selbst HRP-konjugiert oder sie werden durch Sekundärantikörper, die HRP-konjugiert sind, detektiert. Mit Hilfe des ECLPlus-Chemolumineszenznachweises (Amersham) werden Acridan Moleküle durch HRP und Peroxid in Acridiniumester umgesetzt, die wiederum mit Peroxid unter Emission von Photonen der Wellenlänge $\lambda = 430 \text{ nm}$ reagieren. Die Lichtquanten werden mittels eines fotografischen Films (Kodak X-OMAT K Film) gesammelt. Nach der Entwicklung des Films zeigen geschwärzte Stellen das Vorhandensein des interessierenden Proteins an.

2.2.4.14. Ultrafiltration

Flüssig Proben wurden in Filtereinsätze der Firmen Millipore pipettiert und in Abhängigkeit vom MWCO (Molecular weight cut off) entsprechend den Angaben des Herstellers solange zentrifugiert, bis die gewünscht Konzentrierung eintrat.

2.2.5. Biophysikalische Methoden

2.2.5.1. Szintillationszählung

³⁵S-Methionin markierte Proteine wurde in 10 ml Aqua Luna (Sigma) gelöst. Die radioaktive Zerfälle wurden in einem Szintillationszähler (Beckman Instruments) 10 min pro Probe registriert. Es wurden Standardlösungen mit definierter ³⁵S-Methionin-Konzentration angelegt, ebenfalls vermessen und mit den Proben verglichen.

2.2.5.2. Spinmarkierung

Ein 8-POE solubilisiertem Cx43-Halbkanalansatz, der aus einer Schüttelkultur mit 120 ml Medienvolumen stammte, wurde einer Gelfiltration unterzogen. Die nach dem Dot Blot bestimmbare Fraktion mit dem höchsten Cx-Konzentration bei der Halbkanalgröße entsprechendem Kapazitätsfaktor k' wurde soviel einer 100 mM MTSSL-Stammlösung (in Acetonitril gelöst) zugegeben, daß die MTSSL-Endkonzentration 1 mM betrug. Der Ansatz wurde 12 h bei 4°C unter leichtem Rühren inkubiert, anschließend wurde die Probe zum Abtrennen ungebundenen Labels einer Gelfiltration unterzogen.

2.2.5.3. ESR-Spektroskopie

Alle ESR-Messungen wurden mit ESR-Anlagen (Eigenbau Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr-Universität-Bochum, Steinhoff, 1991), die Abb. 2.1. analogen waren, unter Verwendung eines dielektrischen Resonators magnetfeldsynchron (Bruker, B-NM 12 B) aufgezeichnet. Die ESR-Anlage besaß einen Mikrowellenverstärker (Mitec, 30fach-Verstärkung).

Die Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) ermöglicht insbesondere in Kombination mit der ortsspezifischen Spinmarkierung eine detaillierte Untersuchung molekularer Strukturen und Vorgänge. Die gewonnen ESR-Daten sind jedoch nicht direkt mit den Vorgängen im Protein assoziierbar. Die Vielzahl der im ESR-Spektrum wiedergegebenen Wechselwirkungen erfordert einen ausgefeilten methodischen Ansatz sowie eine Interpretation, die die physikalischen Grundlagen miteinbezieht (Galla, 1988).

2.2.5.4. Aufbau des Elektronen-Spin-Resonanz-Spektrometers

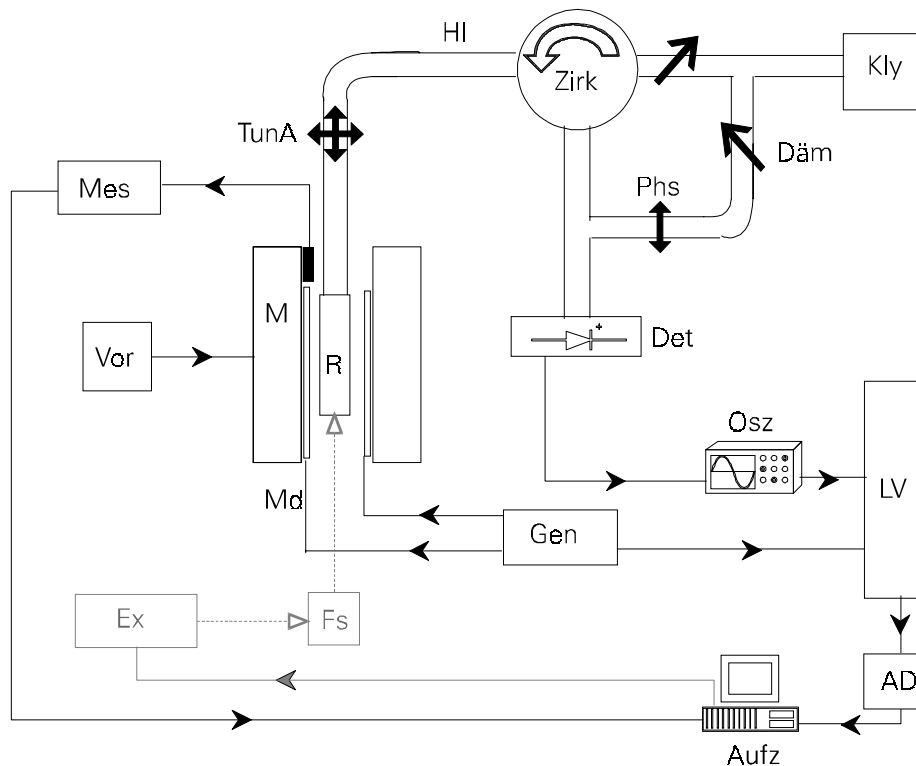


Abb. 2.1.: Schema der ESR-Anlage, grau unterlegt sind die für Photoreaktionen notwendigen Komponenten. **AD** Analog-Digital-Wandler, **Aufz** Aufzeichnung des Spektrums sowie Lasersteuerung mittels Computer, **Däm** Dämpfer zur Leistungsregulierung, **Det** Detektordiode, **Ex** Excimer, **Fs** Farbstoff des excimergepumpten Farbstofflasers, **Gen** 50 kHz - Generator, **HI** Hohlleiter, **Kly** Klystron-Sender (9 GHz), **LV** Lock-In-Verstärker (Phasenempfindlicher Gleichrichter), **M** Elektromagnet für das B_0 -Feld, **Mes** B_0 -Flußdichte-Meßgerät, **Md** Modulationsspulen zur Modulation des B_0 -Feldes, **Phs** Phasenschieber, **R** Hohlraum-Resonator als Probenraum, **TunA** Slide-Screw-Tuner, **Vor** B_0 -Feld-Vorschub, **Zir** Zirkulator.

In Abb. 2.1. ist der schematische Aufbau einer ESR-Spektroskopie-Anlage gezeigt.

Die grundsätzlichen Komponenten, aus denen ein ESR-Spektrometer aufgebaut sein muß, sind wie folgt:

- Ein stabiles externes magnetisches Feld, das durch Elektromagneten erzeugt wird und über einen Feldbereich variiert werden kann.
- Eine Mikrowellenquelle und Mikrowellenleiter, wozu meist eine Klystron-Mikrowellenoszillator-Röhre und Hohlleiter, deren Kantenlänge der Wellenlänge λ der Mikrowelle entspricht, benutzt werden.
- Ein Resonator, in dem sich die Probe befindet.
- Ein Detektor für die Mikrowellenabsorption im Resonanzfall.
- Ein rauschunterdrückendes Verstärkersystem für das Absorptionssignal.
- Eine phasenempfindliche Aufzeichnung, die an eine Modulation des Magnetfeldes gekoppelt ist, um das Signal-Rauschverhältnis zu verbessern.

Sendet das Klystron im Mikrowellen X-Band, so liegt die Frequenz im Bereich von 9 MHz, was einer Wellenlänge von 3.33 cm entspricht. Das Klystron wird abgestimmt und dann auf die Resonanzfrequenz des Resonators eingestellt. Die Probe befindet sich hierbei im Resonator. Eine automatische Frequenzregelung (AFC) sorgt für eine konstante Klystronfrequenz.

Da die in den Resonator eingestrahlte Leistung P_0 variabel sein soll, sind in das Mikrowellensystem Abschwächer eingebaut. Die Ausgangsleistung des benutzten Klystrons beträgt etwa 90 mW.

Durch geeignete Ankopplung bildet sich im Resonator eine stehende Welle aus. Diese Welle ist linear polarisiert, d.h. aus zwei in der xy-Ebene entgegengesetzt umlaufenden circular polarisierten Wellen zusammengesetzt. Der Hohlraumresonator liefert das zur ESR-Messung notwendige magnetische Wechselfeld B_1 .

Das äußere Magnetfeld B_0 definiert die z-Richtung des Laborsystems und steht senkrecht zum B_1 -Feld im Resonator. Die Messung der Flußdichte B_0 dient der magnetfeldsynchronen Aufzeichnung des Spektrums durch den Computer. Die magnetische Flußdichte B_0 wird mit konstanter Änderungsrate erhöht.

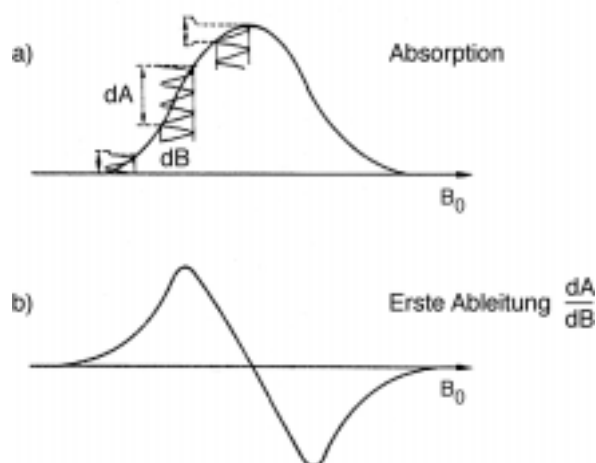
Mikrowellenquelle, Probe und Detektionssystem sind über eine Brückenschaltung verbunden.

Die Mikrowellenstrahlung des Klystrons erreicht den Resonator. Der Resonator ist so an das Hohlleitersystem angepaßt, daß durch Dämpfung die gesamte ankommende Energie verbraucht. Daher tritt keine Reflexion auf. Wird unter Resonanz allerdings Energie von der Probe im Resonator absorbiert, so wird die Anpassung gestört und ein Teil der Mikrowelle wird reflektiert. Hierbei ist die reflektierte Mikrowellenleistung proportional zur durch die Probe absorbierten Mikrowellenleistung. Ein Zirkulator leitet das reflektierte Mikrowellensignal über einen Nachweiszweig zur Diode, einem Kristalldetektor, der eine der Intensität der reflektierten Mikrowelle proportionale Gleichspannung liefert.

Um ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu bekommen, wird dem äußeren Magnetfeld B_0 ein richtungsgleiches Magnetfeld durch einen Generator und zusätzliche Spulen aufmoduliert. Der Modulationshub ΔB_H muß kleiner als die Linienbreite des Spektrums sein.

Diese Überlagerung bewirkt, daß das tatsächliche Magnetfeld $B(t)$ mit dem Modulationshub ΔB_H um das äußere Magnetfeld $B_0(t)$ schwingt. Somit schwingt im Resonanzfall auch die Absorption des Systems. Die Amplitude dieser Schwingung ist das Maß für die Änderung der Absorption bei Änderung des B_0 -Feldes, also die erste Ableitung der Absorption (Abb. 2.2.).

Abb. 2.2.: Die Modulation des externen Magnetfeldes in a) bewirkt die Aufzeichnung der ersten Ableitung des ESR-Absorptionssignals in b).



Die nun am Kristalldetektor entstehende schwingende Spannung (Wechselspannung) als Maß für die erste Ableitung der Absorption $A(B_0)$ wird auf einem Oszillographen beobachtet und einen Lock-In-Verstärker (Phasengleichrichter) zugeführt. Nach der Gleichrichtung wird das ESR-Signal als erste Ableitung der Absorption beobachtet. Dieses Signal wird mittels eines AD-Wandlers digitalisiert und durch einen Computer aufgezeichnet. Die Addition von Signalen verbessert das Signal-Rauschverhältnis mit $n^{1/2}$, wobei n die Anzahl der aufaddierten Signale ist.

2.2.5.5. cw-ESR-Spektroskopie bei Raumtemperatur

Mindestens 10 pmol Cx wurden in eine Quarzrundküvette gefüllt und in einem dielektrischen Resonator positioniert. Bei einer Klystronfrequenz von 9.008 MHz wurde ein Spektrum von 315 bis 327.75 mT durch einen Computer, dem ein 12 bit AD Wandler (Eigenbau Institut) vorgeschaltet war, aufgezeichnet.

2.2.5.6. Spinzahlbestimmung

Eine absolute Quantifizierung ist durch die Vielzahl der zu bestimmenden Faktoren sehr fehlerbehaftet. Es wurde stattdessen eine Vergleichstechnik mit einem bekannten Standard, einer 1 mM MTSSL in 87 % (w/w) Glycerin-Wasser-Lösung, verwandt. Vergleichsmethoden sind von der Linienform und eventueller Übermodulation unabhängig. Die in den Resonator eingestrahlte Mikrowellenleistung P_0 war für Probe und Standard gleich, ferner wurde darauf geachtet, daß man sich nicht im Sättigungsbereich bewegt. Zusätzlich waren Temperatur für Standard und Probe gleich und die Lösungsmittel und Probengeometrie sowie die Resonatorgüte identisch, um Abweichungen der magnetischen Feldstärke der Mikrowelle B_1 zu vermeiden. Die Spinkonzentration konnte nun wie folgt ermittelt werden:

Die Fläche F unter dem Absorptionsspektrum entspricht der Anzahl n_s der in der Probe vorhandenen Spins. F ist proportional zur eingestrahnten Mikrowellenleistung P und der Verstärkung A des Signals. Daraus ergibt sich mit der Proportionalitätskonstanten k folgende Abhängigkeit:

$$F = k \cdot n_{s,0} \cdot A \cdot P \quad (\text{Gl. 2.1.})$$

k lässt sich mit Hilfe einer Referenzprobe bekannter Spinzahl $n_{s,0}$ ermitteln:

$$k = \frac{F_0}{P_0 \cdot A_0 \cdot n_{s,0}} \quad (\text{Gl. 2.2.})$$

Somit ergibt sich die Spinzahl einer unbekannten Probe zu:

$$n_s = \frac{F \cdot A_0 \cdot P_0 \cdot n_{s,0}}{P \cdot A \cdot F_0} \quad (\text{Gl. 2.3.})$$

Wird die eingestrahlte Mikrowellenleistung für die Referenz- und die zu untersuchende Probe gleich gehalten, so vereinfacht sich (3) zu:

$$n_s = \frac{F \cdot A_0}{F_0 \cdot A} \cdot n_{s,0} \quad (\text{Gl. 2.4.})$$

3. Ergebnisse

3.1. Vorüberlegung

Die für die ESR-Spektroskopie notwendige Stoffmenge unter Verwendung eines X-Band Spektrometers und eines dielektrischen Resonators beträgt minimal 6 pmol Spins. Unter der Voraussetzung, daß mindestens eines der Cysteine im C-Terminus eines Connexins eine Reaktion mit einem Methanthiosulfonatspinlabel eingehen kann, ist die zu synthetisierende Proteinstoffmenge 6 pmol, was bei einer molekularen Masse von 43 kd (Cx43) oder 46 kd (Cx46) einer minimal benötigten Proteinmasse von 260 bzw 280 ng entspricht. Sollte mehr als ein Cystein für eine Methantiosulfonatspinlabel zugänglich sein, ist die minimal für die ESR-Spektroskopie notwendige Proteinmasse proportional geringer.

Das Expressionssystem muß neben der Synthese einer ausreichenden Proteinmenge die Möglichkeit zur Expression ortsspezifisch mutagenisierter Connexine bieten. Da der das ESR-Spektrum erzeugende Spinlabel kovalent an einen Cysteinrest bindet, müssen für interessierende Proteinbereiche wie beispielsweise eine postulierte transmembrane α -Helix Cysteinmutanten hergestellt werden. So kann eine ortsspezifische Spinmarkierung durchgeführt werden. Sukzessive werden einzelne, aufeinanderfolgende Aminosäurereste des Wildtypproteins durch Cysteinreste ersetzt (Steinhoff *et al.*, 1995), was als „Cysteinscreening“ bezeichnet wird. Aus der Gesamtheit der ESR-Spektren, die durch einzelne Spinlabel an den aufeinanderfolgenden Positionen im Protein verursachen, kann ein Bild der dreidimensionalen Struktur eines interessierenden Proteinbereichs entwickelt werden.

3.2. Expression von Connexinen

3.2.1. Expression von Cx46 durch ein gekoppeltes *in vitro* Transkription- und Translationssysteme

Mit Hilfe eines *in vitro* Transkriptions- und Translationssystem können Proteine zellfrei synthetisiert werden. In einem Reaktionsgefäß werden sämtliche an der Transkription und Translation beteiligten Komponenten zusammengeführt, um mit der Synthese des interessierenden Proteins zu beginnen. Im Unterschied zur Zelle befinden sich diese Synthesereaktionen allerdings nicht in einem Fließgleichgewicht. Im Reaktionsgefäß, das ein „Batch-System“ darstellt, werden die anfänglich zugesetzten Substanzen verbraucht ohne erneuert oder ersetzt zu werden und erschöpfen sich daher im Verlauf der Synthesereaktionen. Bisher sind kontinuierliche Synthesereaktionen wie in der Zelle, die als „continuous flow“-System bezeichnet werden, technisch nicht realisiert. Aus diesem Grund ist die Stoffmenge synthetisierbarer Proteine, die durch eine *in vitro* Transkription und Translation erreicht werden kann, begrenzt.

Cx46wt cDNA wurde in den Vektor pTS6 kloniert. Das Vektorkonstrukt beinhaltet sowohl eine Promotorstelle für die RNA-Polymerase, eine ribosomale Bindungsstelle sowie das Initiationscodon für die Translation.

Für die *in vitro* Transkription und Translation wurde ein gekoppeltes System verwandt. Dies bedeutet, daß sowohl die Transkription wie auch die Translation im gleichen Reaktionsgefäß stattfinden. Die zugefügten microsomalen Membranen ermöglichen nicht nur den Einbau von Connexinen in eine Lipiddoppelmembran, sondern auch die Aggregation von Connexinen zu funktionalen Connexonen (Falk, 1994 und 1997). Wird zu Beginn der *in vitro* Synthesereaktion die Aminosäure Methionin durch ^{35}S -Methionin ersetzt, so ist es möglich, durch eine hydrodynamische Zuckergradientenzentrifugation und eine anschließende Szintillationszählung zu ermitteln, ob die Connexine sich in den microsomalen Membranen zu Connexonen aggregiert haben. Falk *et al.* (1994) zeigten, daß sich *in vitro* translatierte Connexine, Connexone und Gap Junction Kanäle anhand ihrer unterschiedlichen Sedimentationkoeffizienten unterscheiden lassen.

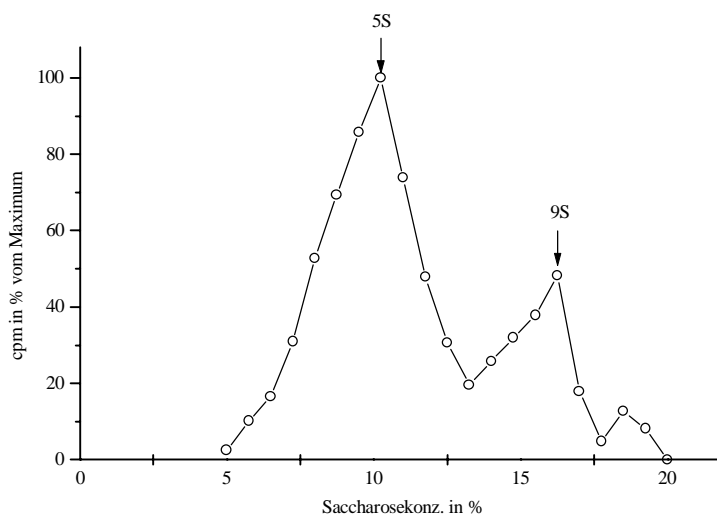


Abb. 3.1.: Zellfreie Synthese und Aggregation von Connexonen, Nachweis durch Zuckergradientensedimentation von GJ Connexinen. Cx46 wurde in der Gegenwart microsomalier Membranen und ^{35}S -Methionin transkribiert und translatiert. Die Microsomen wurden so lysiert, daß die Proteinkomplexe intakt blieben (1% Triton X-100), anschließend wurde die Probe durch einen 5 – 20 % Zuckergradienten sedimentiert. Die Gradienten wurden fraktioniert und Aliquots jeder Fraktion wurden mittels eines Flüssigszintillationszählers auf die radioaktiven Zerfälle pro Minute untersucht. Die Ordinate des Graphen gibt die Zerfälle pro Minute jeder Fraktion relativ zur Fraktion mit der maximalen Anzahl an radioaktiven Zerfällen wieder. Dieser Wert ist abgetragen über der Abszisse, die die Zuckerkonzentration in % (w/v) darstellt. Fraktionen, die 5S Partikel (monomeres Connexin) oder 9S Partikel (aggregierte GJ Connexone) enthalten, sind durch Pfeile markiert.

Die Zuckergradientendichtezentrifugation stellt eine Identifizierungsmethode für Connexone dar. Im Zuckerkonzentrationsbereich von 13 bis 17 % (w/v) sind die hexameren Connexone enthalten. Werden die Absolutwerte der Zerfälle pro Minute jeder Fraktion im Bereich von 13 bis 17 %

summiert, so kann die synthetisierten Proteinmenge berechnet werden. Im Mittel konnten $0,5 \cdot 10^{-15}$ mol an Cx46 pro 25 μ l Transkriptions- und Translationsreaktionsansatz synthetisiert werden. Die in den Vorüberlegungen dargestellte minimale Stoffmenge an Connexinen für die ESR-Spektroskopie beträgt 6 pmol. Damit wären minimal 1200 Ansätze mit je 25 μ l Reaktionsvolumen, also 30 ml, nötig, um die für eine ESR-Messung notwendige Cx43-Proteinmenge zu synthetisieren.

3.2.2. Expression von 6xHis-Cx46 in Sf9 Insektenzellen durch eine Baculovirus vermittelte Transfektion

Das Baculoviren-Expressionssystem bietet den Vorteil des sehr starken viralen Polyhedrinpromotors für die Transkription sowie die Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation von eukaryonten Proteinen. Stauffer *et al.* (1991) und Buehler *et al.* (1995) konnten zeigen, daß die Expression von Cx32 und Cx26 in Sf9-Insektenzellen durchgeführt werden kann.

Im Transferplasmid pBlueBacHisSiteBCx46 war die Cx46 cDNA 3' im ORF eines 6xHis-Epitops kloniert. Dieser Ansatz sollte die Reinigung der exprimierten Connexine in der Form von Connexonen über eine Nickelchelatsäule (NiNTA) ermöglichen. Das Vektorkonstrukt wurde sequenziert, um sicherzustellen, daß sich die Cx46-cDNA im ORF hinter dem 6xHis-Epitop befindet und keine ungewollten Mutationen in die Cx46 cDNA durch die Klonierungsarbeiten eingeführt wurden. Die Sequenzierungsarbeiten erlaubten ein uneingeschränktes weiteres Vorgehen.

Dieser Vektor wurden am Institut für Anatomie sowie am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund für die Kotransfektion von Sf9 Zellen verwandt. Für jedes Transfektionsexperiment wurden Kontrollexperimente durchgeführt, in denen nur das Transfektionsreagenz, das Plasmid oder die linearisierte Baculovirus-DNA den Insektenzellen zugesetzt wurde.

In dem verwandten System wird der Vektor, der die zu exprimierenden cDNA enthält, mit liniarisierten Baculovirus-DNA kotransfiziert. Die Vektor DNA enthält ein 5'-Fragment der β -Galaktosidase, während die virale DNA das Restfragment der β -Galaktosidase trägt. Das Expressionssystem ist so konzipiert, daß nach der Kotransfektion von Vektor und linearisierter Baculovirus-DNA ein Rekombinationsereignis stattfinden kann. Die interessierende cDNA aus dem Vektor und die virale DNA tauschen DNA-Sequenzen aus, hierbei gelangt die interessierende cDNA mitsamt dem 5'-Fragment der β -Galaktosidase so in die virale DNA, daß das „upstream“-Fragment der β -Galaktosidase sich mit dem Rest des β -Galaktosidasegens zum kompletten und funktionale Gen ergänzt.

Solch ein erfolgreiches Rekombinationsereignis führt zu einer zirkulären viralen DNA. Dieses Virus nutzt den DNA-Replikations- sowie den Proteinsyntheseapparat der Wirtszelle, um einerseits die eigene DNA zu vervielfachen und andererseits die viral codierten Gene zu exprimieren. Zu

diesen Genen gehören die einklonierte interessierende cDNA wie auch die nun funktionale β -Galaktosidase. Dem Insektenzellmedium wird X-Gal sowie Agarose zugesetzt. Die Agarose geliert das Medium und verhindert die Diffusion des Indigo-Farbstoffes, der nach der enzymatischen Spaltung des X-Gals entsteht und durch die Lyse der Insektenzellen freigesetzt wird.

In parallelen Versuchreihen konnte weder am Institut für Anatomie noch am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund blauegefärbte Plaques erzeugt werden, die auf eine erfolgreiche Vermehrung rekombinater Baculoviren mit der dazugehörenden Lyse der Insektenzellen hätten schließen lassen.

Allerdings konnten Plaques mit einer milchigen Färbung ausfindig gemacht werden. Diese Plaques entstehen durch Religationseignisse der linearisierten wt-Baculovirus-DNA. In diesem Fall wird das 5'-Fragment der β -Galaktosidase aus dem Transfervektor nicht durch ein Rekombinationsereignis in die wt-Baculovirus-DNA eingebaut. Somit kann keine β -Galaktosidase synthetisiert werden und damit das X-Gal nicht hydrolytisch gespalten werden.

Da mögliche Ursachen für das Unterbleiben eines Rekombinationsereignisses ein fehlerhaftes Transfektionsreagenz, ein fehlerhaftes Transferplasmid oder eine fehlerhafte wt-Baculovirus-DNA sein konnten, wurde jedes Reagenz separat den Insektenzellen zugegeben, ohne daß es zu einem Effekt auf das Zellwachstum oder die Morphologie der Zellen gekommen wäre. Eine cytotoxische Wirkung dieser Reagenzien konnte aufgrund der Kontrollexperimente ausgeschlossen werden.

Weiterhin konnte für das Transfektionsreagenz und die Baculovirus-DNA eine fehlerhafte Charge ausgeschlossen werden, da einerseits diese Reagenzien erneut bestellt wurden oder bei den Versuchen am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund die dort vorhandenen Chargen verwandt wurden.

Ebenso sollte ein fehlerhaftes Transferplasmid auszuschließen sein. Das eingesetzte Stammpiasmid pBlueBacHisSiteB wurden in Dortmund bereits erfolgreich eingesetzt. Die in Dortmund benutzten Chargen wurde am Institut für Anatomie in Essen weitergeführt. Restriktionsanalysen sowie die Sequenzierungen nach den Klonierungsschritten deuteten in keinem Fall auf eine Veränderung der Plasmide hin.

Um die Hypothese zu stützen, daß 6xHis-Cx46 eine cytotoxische Wirkung besitzt, wurden HeLa Zellen mit der 6xHis-Cx46 cDNA, die sich in einem dafür geeigneten Vektor befand, transfiziert.

3.2.3. Expression von 6xHis-Cx46 in HeLa Zellen

HeLa-Zellen bieten als Expressionssystem den Vorteil, parental keine Connexine zu exprimieren. So sind sie bereits mehrfach für die Expression verschiedener Connexintypen benutzt worden (Traub *et al.*, 1994; Verselis *et al.*, 1994; Elfang *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 1998). Allerdings konnte

in keinem Fall ein Expressionsniveau erreicht werden, daß eine Aufreinigung ausreichender Proteinmengen für spektroskopische Zwecke gewährleistet hätte.

Die in dieser Arbeit mit HeLa-Zellen durchgeführten Expressionsexperimente dienten vor allem der Überprüfung der für Insektenzellen postulierten cytotoxischen Wirkung von 6xHis-Cx46. Hierzu wurde 6xHis-Cx46-cDNA in den Expressionsvektor pKEX1 kloniert. Die Klonierung wurde durch eine DNA-Sequenzierung verifiziert. Das Plasmid pKEX1-6HisCx46 wurde in HeLa-Zellen transfiziert. Parallel dazu wurden Kontrollexperimente durchgeführt, in denen entweder nur das Plasmid oder nur das Transfektionsreagenz dem Zellmedium zugesetzt war. Diese Kontrollexperimente zeigten für alle durchgeführten Versuche, daß weder das Transfektionsreagenz noch das Plasmid cytotoxische Wirkung auf die HeLa-Zellen besaßen. Die Zellen, deren „Kill-Curve“ für das Antibiotikum Hygromycin zuvor bestimmt wurde, waren nach der Transfektion mit pKEX1-6His-Cx46 einem Selektionsdruck von 200 µg/ml Hygromycin für sieben Tage ausgesetzt. Die zur Kontrolle der Selektion mitgeführten parentalen HeLa-Zellen starben unter diesem Selektionsdruck nach vier Tagen, während die transfizierten Zellen weiter wuchsen. Diese Klone wurden gepickt und unter einer Hygromycinkonzentration von 50 µg/ml weiter passagiert. Unter diesen Bedingungen wuchsen die transfizierten HeLa-Zellen bedeutend langsamer als unter gleichen Bedingungen gehaltene nicht transfizierte HeLa-Kontrollen.

21 Tage nach der Transfektion, entsprechend Passage 3, wurde eine Immunhistochemie durchgeführt (Abb. 3.2.). Eine zur Kontrolle durchgeführte Immunhistochemie der parentalen HeLa-Zellen zeigte keine Fluoreszenzsignale, so daß eine Kreuzreaktion der benutzten Antikörper ausgeschlossen werden kann. 6xHis-Cx46 war in den immunhistochemisch positiven Zellen hauptsächlich membranständig lokalisiert. In den cytosolischen Bereichen der Zellen konnte nur wenig 6xHis-Cx46 nachgewiesen werden. Neben den 6xHis-Cx46 exprimierenden Zellen gab es HeLa-Zellen, die anscheinend durch die Hygromycinselektion eine entsprechende Resistenz besaßen, ohne jedoch für Cx46 positiv zu sein.

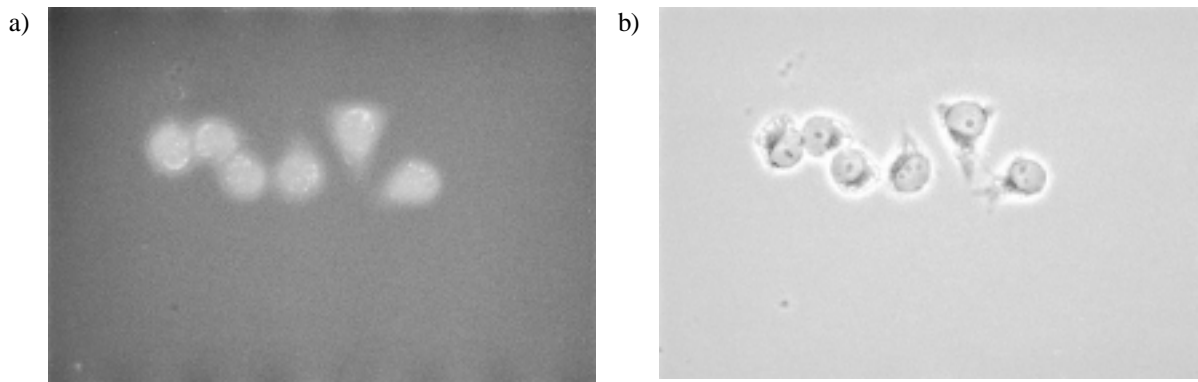


Abb. 3.2.: HeLa-Zellen, mit pKEX1-6His-Cx46 transfiziert. Cx46 wurde durch eine immunhistochemische Untersuchung zunächst mit einem pk Anti Cx46 Antikörper (Rabbit) markiert, der wiederum von einem FITC-markierten Anti-Rabbit Antikörper erkannt wurde. a) zeigt HeLa-Zellen bei 400facher Vergrößerung. Die Betrachtung erfolgt durch einen FITC-Filtersatz. Die hellen Punkte zeigen die FITC-markierten Connexine an. b) zeigt die gleichen Zellen im Phasenkontrast.

In einer zweiten immunhistochemischen Untersuchung der gleichen Zellen 30 Tage nach der Transfektion konnte für die vormals noch partiell 6xHis-Cx46 exprimierenden Zellen keine 6xHis-Cx46-Expression nachgewiesen werden. Eine Erhöhung des Hygromycinselektionsdrucks auf 200 $\mu\text{g/ml}$ zeigte, daß diese Zellen überleben konnten, während zur Kontrolle mitgeführte parentale, nicht transfizierte HeLa-Zellen abstarben.

Das gesamte Transfektionsexperiment wurde unter den gleichen Bedingungen nochmals durchgeführt, und bestätigte den beschriebenen Befund, daß N-terminal 6xHis-markiertes Cx46 eine cytotoxische Wirkung besitzt.

Da eine Aufreinigung über eine Nickelchelatsäule angestrebt wurde, bot sich nun eine C-terminale Markierung eines Connexins mit einem 6xHis-Epitop an. Bukauskas *et al.* (2000) zeigten, daß eine Fusion des EGFP an den C-Terminus in HeLa-Zellen zur Expression von Cx43 zu funktionalen Gap Junctions führt. Eine Transfektion von HeLa-Zellen mit einer Cx43 cDNA, die N-terminal für das EGFP kodierte, gelang dagegen nicht (Bukauskas, persönliche Kommunikation). Da sich Cx43 damit als unempfindlich für die C-terminale Fusion mit einem zusätzlichen Peptidstrang erwiesen hatte, wurde für die weiteren Arbeiten Cx43 verwandt.

3.2.4. Stabile Transfektion von Insektenzellen mit Cx43-6xHis

Die stabile Transfektion von Insektenzellen bietet ähnliche Vorteile wie die transiente Infektion von Insektenzellen durch rekombinante Baculoviren. So erreichen auch membranständige Proteine hohe Expressionsniveaus, weiterhin können posttranslationale Modifikationen ähnlich denen in Säugerzellen durchgeführt werden. Die stabile Transfektion von Insektenzellen bietet den zusätzlichen Vorteil, daß eine kontinuierliche Synthese und Isolierung des zu untersuchenden Proteins stattfinden kann, da die Zellen nicht wie im Baculovirensystem lysiert werden. Diese Lyse hat zur Folge, daß immer wieder Neuinfektionen von parentalen Zellen notwendig sind, um weitere Mengen des interessierenden Gens zu exprimieren.

Cx43-cDNA aus der Ratte (Beyer *et al.*, 1987) wurde in den ORF des Expressionsplasmids pIZTV5His kloniert. Das Plasmid pIZTV5His besitzt eine Zeocinresistenz (*Sh ble* – Gen, Calmels *et al.*, 1991; Drocourt *et al.*, 1990) sowie das an die Zeocinresistenzgen fusionierte Green Fluorescent Protein (GFP). Werden Insektenzellen mit einem pIZTV5His-Plasmid transfiziert, so exprimieren die Zellen GFP. Eine Betrachtung solcher Zellen durch ein Fluoreszenzmikroskop mit einer Anregungswellenlänge von 460 bis 490 nm und einem Fluoreszenzfiltersatz von 515 bis 550 nm (entspricht dem FITC-Filtersatz) läßt die sofortige Identifizierung von transfizierten Zellen zu.

3' der MCS (Multiple Cloning Site) befindet sich das virale V5-Epitop, das aufgrund seiner Sequenz hochspezifisch und ohne Kreuzreaktion vom monoklonalen Anti-V5-Antikörper detektiert wird (Southern *et al.*, 1991). Daran schließt sich 3' ein 6xHis-Epitop an. Um das am 3'-Ende liegenden Stoppkodon der Cx43-cDNA nicht 5' vor das V5-Epitop sowie das 6xHis-Epitop in den Expressionsvektor zu klonieren, wurden die letzten vier Aminosäuren des C-Terminus deletiert. Restriktionsanalysen des Vektorproduktes sowie eine DNA Sequenzierung zeigten, daß sich die Cx43wt-cDNA im ORF des V5-Epitops und 6xHis-Epitops befanden.

Für die Expression des Cx43-6xHis wurden High Five Insektenzellen ausgewählt. Diese Zelllinie bietet im Vergleich zu Sf9 und Sf21 Zelllinien für viele Proteine ein höheres Expressionniveau (Davis *et al.*, 1992). Die dazu notwendige Transfektion der Insektenzellen geschah mittels einer Lipofektion und konnte aufgrund der Expression des an die Zeocinresistenz gekoppelten GFP unter einem Fluoreszenzmikroskop überprüft werden (Abb. 3.3.).

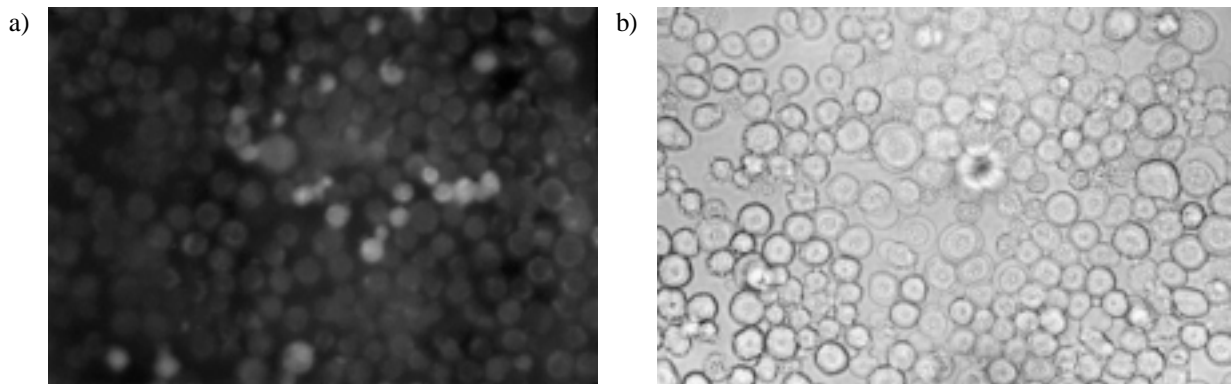


Abb. 3.3.: High Five Zellen, mit pIZTV5His/Cx43wt transfiziert. Das Plasmid codiert für GFP, das konstitutiv exprimiert wird. a) zeigt zur Fluoreszenz angeregtes GFP in High Five Zellen. Die Betrachtung erfolgte mittels eines FITC-Filtersatzes bei 400facher Vergrößerung. b) zeigt die gleichen Zellen im Phasenkontrast.

Zur Transfektionskontrolle wurden High Five Zellen die für die Transfektion benötigten Reagenzien einzeln ausgesetzt. Weder die alleinige Behandlung der Insektenzellen mit dem Expressionsplasmid oder dem Transfektionsreagenz beeinträchtigte die Zellen in ihrem Wachstum oder ihrem Erscheinungsbild unter dem Phasenkontrastmikroskop. Ebenfalls zu Kontrollzwecken wurden Insektenzellen mit einem für das CAT-Gen codierenden pIZTV5HisCAT Plasmid transfiziert. Dieser kommerzielle Transfektionvektor codiert für ein Fusionprotein aus CAT, dem viralen V5-Epitop sowie dem 6xHis-Epitop. Dieses Genprodukt besitzt eine molekulare Masse von 32 kd. Weiterhin wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle mitgeführt.

Die Zellen wurde 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop auf die Relation transfizierter Zellen zu nicht transfizierten Zellen untersucht. 1-5% der Insektenzellen zeigten 24 h nach der Transfektion die für das GFP typische grünliche Fluoreszenz. 48 h bzw. 72 h nach der Transfektion fluoreszierten 10-20 % der Insektenzellen. Dies galt sowohl für das Cx43-Gen tragende Plasmid pIZTV5HisCx43 wie auch das für das CAT tragende Kontrollplasmid pIZTV5HisCAT und stimmt mit der zu erwartenden Transfektionseffizienz (Davis *et al.*, 1992) sehr gut überein. Transiente Transfektionen wurde durch eine SDS-PAGE Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot auf die Expression von Cx43-6xHis hin überprüft. Es wurden pro Probenasche 3µg Gesamtproteinmenge aufgetragen. Abb. 3.4. zeigt, daß nach 48 h das Maximum der Cx43 Expression erreicht ist, die Cx43-Menge in der Zelle bleibt bis 72 h nach der Transfektion konstant.

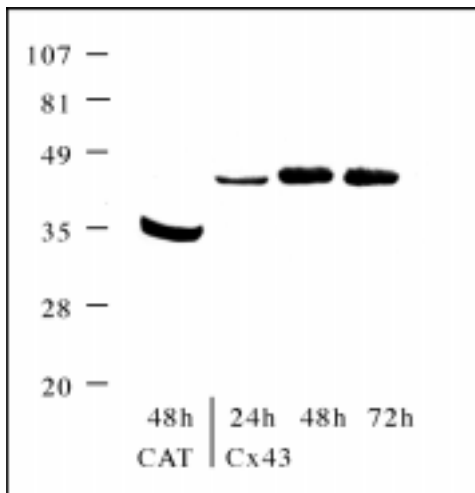


Abb. 3.4.: SDS-PAGE (12 %) mit anschließendem Western Blot einer transienten Transfektion von High Five Zellen mit pIZTV5His-Cx43 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion. Zur Kontrolle wurde eine Transfektion mit pIZTV5His-CAT durchgeführt. CAT trägt C-terminal als Fusionsprotein ein V5- sowie ein 6xHis-Epitop und weist damit eine molekulare Masse von 32 kD auf. Bei äquivalent aufgetragenen Gesamtproteinmengen ist die Expression von Cx43 nach 48 h am stärksten. Die Zahlen am linken Rand besitzen die Einheit kD. Der Western Blot wurde mit einem HRP konjugierten mk Anti-V5 Antikörper durchgeführt.

Die transfizierten High Five Zellen wurden 48 h nach der Transfektion einer insgesamt 14-tägigen Zeocinselektion ausgesetzt. Die Insektenzellen wurden für die ersten sieben Tage einer Zeocinkonzentration im Insektenzellmedium von 800 µg/ml ausgesetzt. Vom 8. bis zum 14. Tag betrug die Zeocinkonzentration 1200 µg/ml. Vorversuche hatten ergeben, daß eine Startkonzentration von 1200 µg/ml die Insektenzellen zu stark schädigte. Nach 14 Tagen konnten Klone von einigen 100 Zellen nachgewiesen werden. Diese Klone zeigten unter einer Anregungswellenlänge von 460 nm die für das GFP typische grünliche Fluoreszenz. Die Zellen wuchsen bis zur Konfluenz, so daß für das Cx43-Gen eine polyklonale High Five Cx43 Zelllinie entstand. Die transfizierten und selektionierten Zellen wurden weiterhin unter einer Zeocinkonzentration von 50 µg/ml gehalten. Die Insektenzellen erwiesen sich nach dieser Untersuchung als stabil Cx43-6xHis exprimierend (Abb 3.5.).

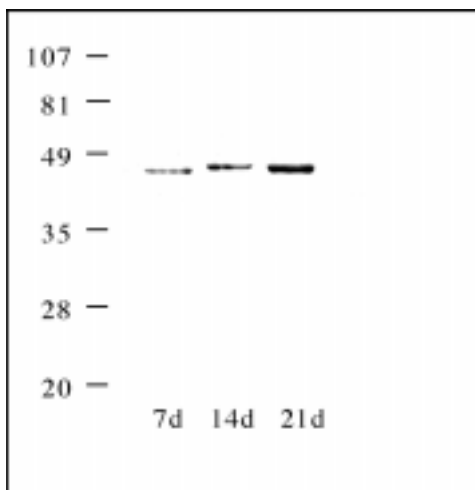


Abb. 3.5.: SDS-PAGE (12 %) mit anschließendem Western Blot einer stabilen Transfektion von High Five Zellen mit pIZTV5His-Cx43 7d, 14d und 21d nach Beendigung der Selektion. Die Zellen erwiesen sich als stabil Cx43 exprimierend. Die Zahlen am linken Rand besitzen die Einheit kD. Der Western Blot wurde mit einem HRP konjugierten mk Anti-V5 Antikörper durchgeführt.

Die stabil Cx43-6xHis exprimierenden High Five-Zellen wurden immunhistochemisch auf die Lokalisation der Cx43-6xHis in der Zelle untersucht. Wie Abb. 3.6. zeigt, konnte Cx43-6xHis sowohl cytosolisch wie auch membranständig nachgewiesen werden. Die an der Zelloberfläche auftretende Markierung kann als die Aggregation von Cx43-6xHis Proteinen zu Gap Junction Plaques gedeutet werden (Unger *et al.*, 1999 b).

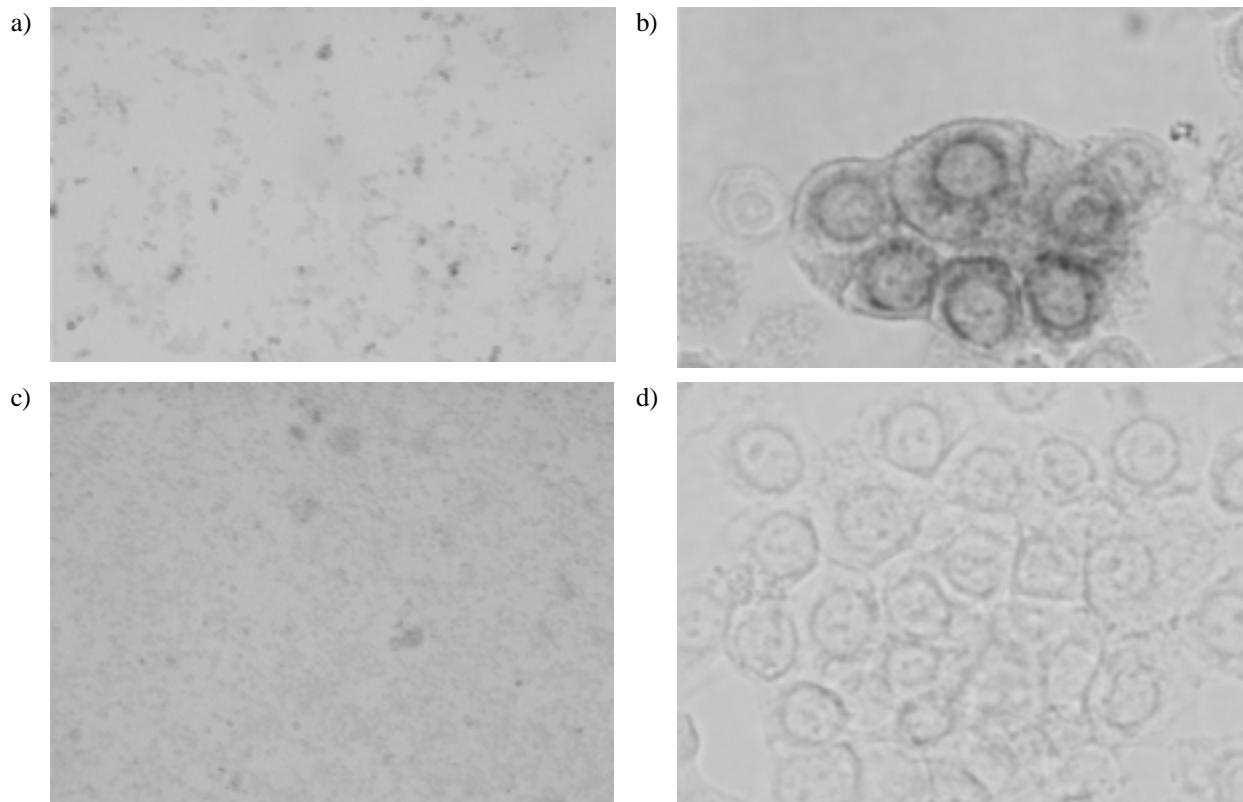


Abb. 3.6.: Immunhistochemische Untersuchung der stabil Cx43-6xHis exprimierenden High Five Insektenzellen. Ein HRP konjugierter mk Anit V5 Antikörper koppelte an das entsprechende Epitop, das C-terminal an das Cx43 fusioniert war. Nach der Zugabe von DAB zeigt das dunkle Reaktionsprodukt die Lokalisation von Cx43 an. a) und b) zeigen die DAB markierten Connexine bei 10facher und 400facher Vergrößerung. c) und d) zeigen gleich behandelte nicht transfizierte Insektenzellen bei entsprechender Vergrößerung.

3.2.5. Ortspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese des Cx43-wt-Gens zu Cx43K146C wurde durch PCR-Overlap-Extension erzielt (Ho *et al.*, 1989). Abb.3.7. veranschaulicht die dazu erforderlichen zwei PCR-Schritte. In einem ersten PCR-Schritt wurden zwei DNA-Fragmente synthetisiert: Ein „upstream“-Fragment des Cx43-Gens mit der gewünschten Mutation am 3'-Ende, sowie ein „downstream“-Fragment, das die Mutation am 5'-Ende trägt. Jedes Fragment wird von seinem Mutageneseprimer, der an der gewünschten Aminosäuresequenzposition ein geändertes Basentriplett aufweist, und einem antiparallel dazu gelegenen, dem Wiltyp homologen Globalprimer, eingerahmt.

In einem zweiten PCR-Schritt wurden die sich im Bereich der Mutation überlappenden Fragmente unter Zugabe beider Globalprimer vereinigt, es entstand ein die Mutation tragendes Fragment. Nach Restriktionsverdau mit Spe I und Sac II konnte das 1152 (vom Initiationscodon bis zum deletierten C-Terminus) lange Fragment in das Plasmid pIZTV5His ligiert werden.

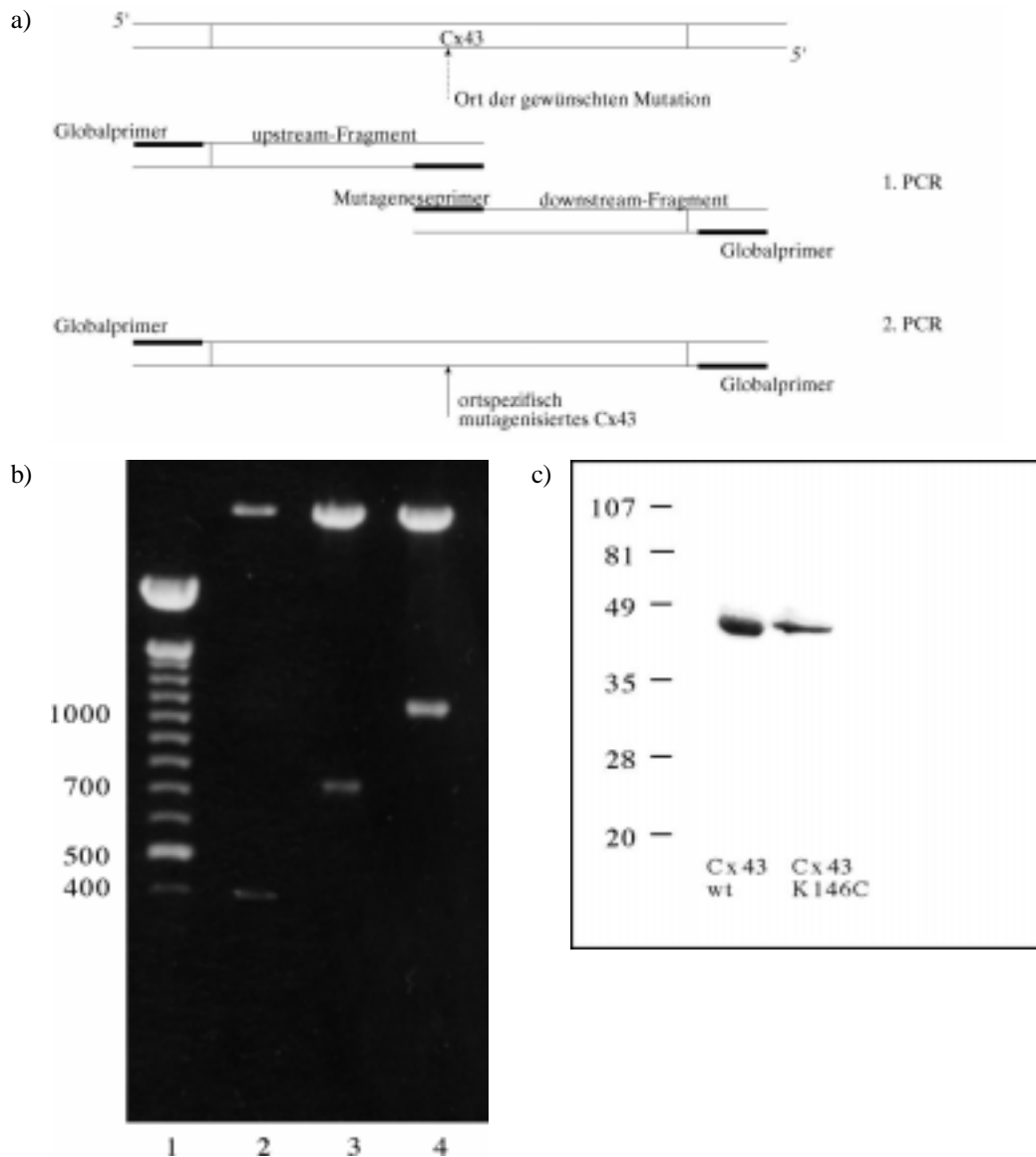


Abb. 3.7.: Generierung der ortspezifischen Cysteinmutation Cx43K146C. a) zeigt schematisch die für die Erzeugung der ortspezifischen Mutation notwendigen PCR-Schritte. b) gibt die entsprechenden PCR-Produkte wieder, wobei folgende Zuordnung gilt: Spur 1: 100 bp Marker, Spur 2: upstream-Fragment, Spur 3: downstream-Fragment, Spur 4: DNA-Fragment nach der 2. PCR. c) zeigt die Cx43 Cysteinmutante Cx43K146C nach einer transienten Expression in High Five Zellen im SDS-PAGE (12 %) und anschließendem Western Blot. Der Western Blot wurde mit einem HRP konjugierten mk Anti-V5 Antikörper durchgeführt. Die Zahlen am linken Rand besitzen die Einheit kD.

3.3. Aufreinigung der Connexine

Für eine erfolgreiche ESR-Spektroskopie ist neben einer ausreichenden Proteinmenge die Probenreinheit ein entscheidender Parameter für den Erhalt aussagekräftiger ESR-Spektren. Die in der Doppelmembran eingebundenen Halbkanäle oder die in zwei Doppelmembranen verhafteten ganzen Kanäle müssen von den cytosolischen sowie allen Nicht-Connexin-Membranproteinen getrennt werden. Proteine, die nach der Isolation von Connexinen in der Probe als Verunreinigung zurück bleiben, sind potentielle Träger freier Cysteinreste. Cysteinreste von Fremdproteinen können Spinlabelmoleküle binden, deren ESR-Spektren sich zum Spektrum der Spinlabelmoleküle, die an Connexine gekoppelt sind, hinzuaddieren. Das gemessene Gesamt-ESR-Spektrum wird vom interessierenden ESR-Spektrum der Connexine abweichen. Daher ist eine Aufreinigungsmethode, die eine sehr hohe Probenreinheit erzeugt, eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche ESR-Spektroskopie.

Eine weitere Voraussetzung für eine aussagekräftige ESR-Spektroskopie, ist der Erhalt der nativen Struktur und Funktion des Proteins während des Aufreinigungsprozesses. Eine Vielzahl von Reaktionsbedingungen, die zur Aufreinigung von Proteinen eingesetzt werden können, beeinflussen irreversibel die Struktur sowie die Funktion eines Proteins. Die Wahl von Reagenzien, des pH-Wertes sowie der Temperatur ist von entscheidender Bedeutung.

Zur Solubilisierung von Halbkanälen sind bereits verschiedene nicht ionische Detergenzien eingesetzt worden (Kistler *et al.*, 1994; Loo *et al.*, 1995; Buehler *et al.*, 1995; Rhee *et al.*, 1996). Es konnten Detergenzien und Reaktionsbedingungen für den Solubilisierungsprozeß bestimmt werden, die die native Struktur und Funktion von Cx-Halbkanälen unbeeinflusst lassen, dabei aber vorhandene Cx-Halbkanäle sehr effektiv in Lösung bringen. Hierzu zählen 8-POE (CMC = 0.23 %, 6 mM) sowie 8-GLU (CMC = 0.89 %, 30 mM). 8-POE zeigt im Vergleich zu 8-GLU eine stärkere Selektivität Connexine anstatt anderer Membranproteine zu solubilisieren (Kistler *et al.*, 1994). Triton-X-100 zeigt ebenfalls eine erhöhte Selektivität für Connexine, (Kistler and Bullivant, 1988). Es besitzt allerdings nur eine sehr niedrige CMC (0.02 %, 0.24 mM). Eine niedrige CMC bewirkt, daß die Connexine auch bei sehr niedrigen Detergenzkonzentration in einem solubilierten Zustand bleiben, was die Aggregation von Connexonen während eines Dialyseprozesse stark erschwert (Kistler *et al.*, 1994).

Als große Schwierigkeit hat sich in der Connexin-Strukturforschung die Wahl einer geeigneten Trennmethode herausgestellt, die die solubilierten Cx-Halbkanäle von Nicht-Connexin-Proteinen effektiv separiert. Bisher hat die Immunoaffinitätschromatographie (Loo *et al.*, 1995, Rhee *et al.*, 1996) die bei weitem größte Reinheit von Cx-Halbkanälen erzeugt. Doch beinhaltet diese Methode einen obligatorischen Reinigungsschritt mit einem pH-Wert von 4 oder geringer. Die Autoren wählten hierfür eine Reaktionszeit von 5 s, um Denaturierungen der Cx-Halbkanäle zu vermeiden. Reaktionen die bei diesem pH-Wert stattfinden wie beispielsweise die Protonierung von Histidinresten ($pK_S = 6,5$), Glutamat- und Aspartatresten (für beide $pK_S = 4,4$) sowie die

Verschiebungen im Wasserstoffbrückengerüst von α -Helices oder β -Faltblattstrukturen, sind um Größenordnungen schneller als 5 s. Diese Reaktionen können aufgrund von Ladungsveränderungen zu strukturellen Umlagerungen im Protein führen, die möglicherweise irreversibel sind. Daher erscheint eine Behandlung von Connexinproteinen mit Lösungen, die einen pH-Wert von 4,0 besitzen, nicht angebracht, wenn strukturelle oder funktionelle Fragen untersucht werden.

3.3.1. Aufreinigung durch ein 6xHis-Epitop

Die Aufreinigung 6xHis-markierter Proteine bietet im allgemeinen den Vorteil neben der hohen Spezifität, mit der diese Proteine an eine Ni-NTA-Matrix binden, diese Proteine bei milden Bedingung im neutralen pH-Bereich eluieren zu können. Werden 6xHis-markierte Membranproteine in Insektenzellen exprimiert, muß allerdings an die Ni-NTA-Affinitätschromatographie ein zweiter Auftrennungsschritt angeschlossen werden. Insektenzellen exprimieren nativ eine Reihe von Proteinen, die mehr als ein Histidin in Serie hintereinander besitzen. Diese Proteine besitzen ebenfalls eine Affinität zur Ni-NTA-Matrix und sind durch entsprechende Waschpuffer nur schwer oder gar nicht von der Säule zu entfernen. (Nekrosova *et al.*, 1996).

Cx43-Halbkanäle aus transfizierten High Five Insektenzellen wurden mittels des nichtionischen Detergenzes 8-POE solubilisiert. Die so erzeugte Probe besteht aus den interessierenden solubilisierten Cx43-Halbkanälen sowie einer großen Zahl weiterer solubilisierter Membranproteine. Die während des Aufreinigungsprozesses gewonnene cytosolische Fraktion zeigte bei Kontrolluntersuchungen mittels Immunoblot niemals ein positives Cx43-Signal.

Im Batch-Verfahren wurde die Probe mit der Ni-NTA-Matrix inkubiert. Nach dem Waschen wurde die Ni-NTA-Matrix mit einem 500 mM NTA-Imidazolelutionspuffer eluiert.

Abb. 3.8. a) zeigt, daß ein großer Teil der 8-POE solubilisierten His-markierten Cx43-Proteine nicht an die Ni-NTA-Matrix bindet. Sowohl in der Durchlaufraktion, wie auch in der ersten Waschfraktion können große Mengen an Cx43-6xHis nachgewiesen werden. Durch eine Elution mit 500 mM Imidazol konnte eine nachweisbare Menge Cx43 aus der Säule gelöst werden. Jedoch zeigt Abb. 3.8. b), daß die Eluatsfraktion Verunreinigungen aufwies, während eine Bande, die angereichertes Cx43 anzeigte, fehlt. Damit ist der Anteil verunreinigender Proteine größer als der Anteil der Cx43-Moleküle an der Gesamtproteinmenge des Eluats. Die Verunreinigungen ließen sich durch den Einsatz von 20 mM Imidazol und 2 M NaCl im Waschpuffer minimieren. Die Schwierigkeit der geringen Bindung von Cx43-Halbkanälen an die NiNTA-Matrix beeinflusste dies jedoch nicht.

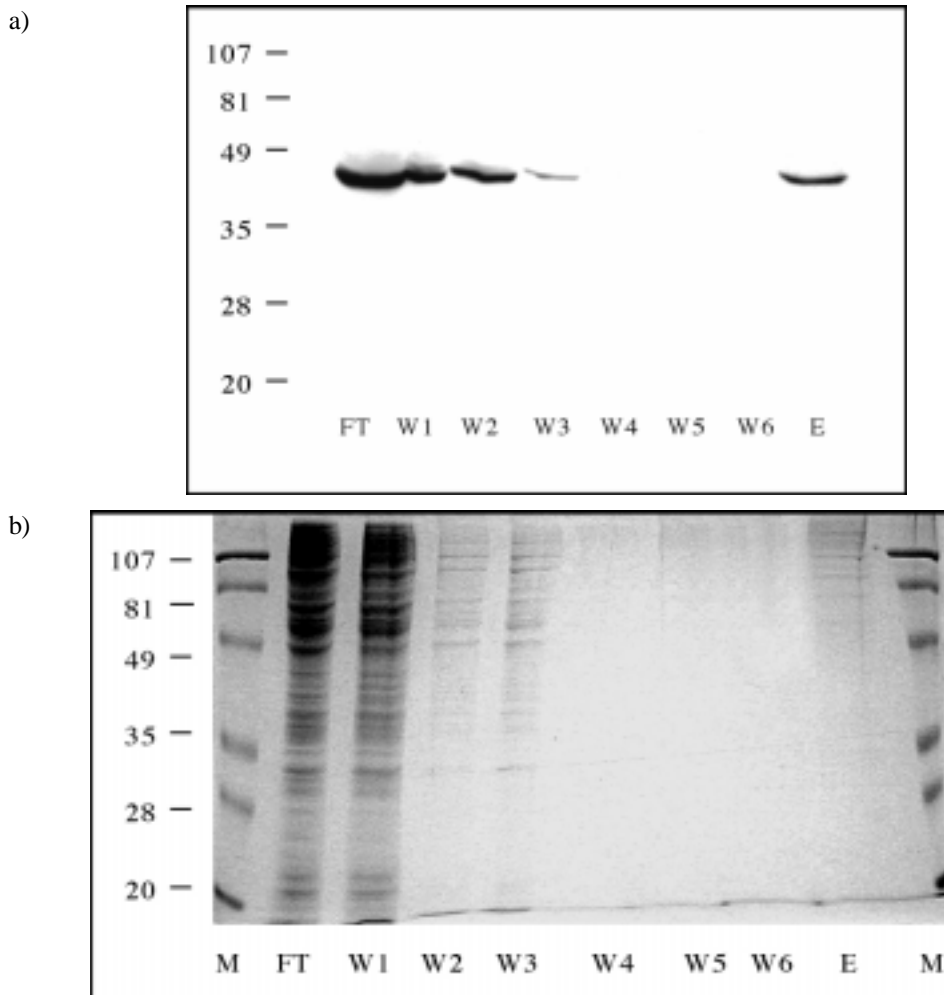


Abb. 3.8.: Zwei SDS-PAGE-Gele (12 %) mit identischer Spurbelegung. In a) wurde das Gel einem Western Blot unterzogen. Eluiertes Cx43 ist nachweisbar. b) zeigt ein identisch belegtes Gel, allerdings Coomassie gefärbt. Hier sind in der Eluatsspur zwar Verunreinigungen durch Fremdproteine sichtbar, jedoch ist keine Cx43-spezifische Bande identifizierbar. E: Eluat, FT: Durchlauf, M: Größenmarker, W: Waschen der Säule. Die Zahlen am linken Rand besitzen die Einheit kD. Der Western Blot wurde mit einem HRP konjugierten mk Anti-V5 Antikörper durchgeführt.

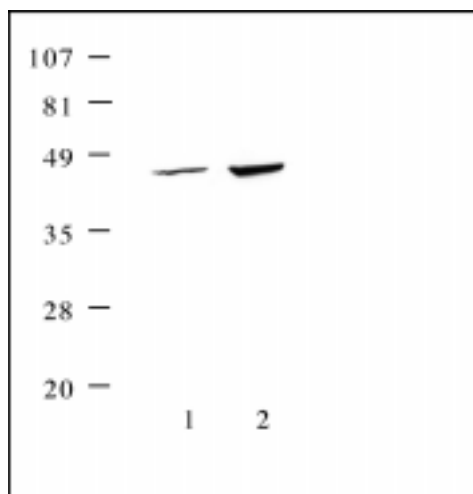
Eine densitometrische Auswertung zeigt, daß der Anteil der eluierten Cx43-Proteine nur etwa 1 % der Menge an Cx43 beträgt, die durch die Säule hindurchläuft. Die absolut eingesetzte Cx43-Menge betrug ca. 1 mg (Berechnung siehe Zweischritt-Gelfiltration). Dies bedeutet, daß die gesamte eluierte Cx43-Proteinmenge nur etwa 10 µg betrug. Somit mußte entweder ein schwaches Bindungsvermögen der Cx43-Halbkanäle an die Matrix vorliegen oder die gebundenen Cx43-Halbkanäle ließen sich nicht effektiv von der Ni-NTA-Matrix eluieren. Um die zweite Hypothese der ineffektiven Elution von NiNTA-Matrix zu überprüfen, wurde die Imidazolkonzentration im Elutionspuffer schrittweise bis zu Löslichkeitsgrenze erhöht. Dies erbrachte keine verbesserte Elution der Cx43-Halbkanäle.

Ein sehr starkes Elutionsmittel stellt eine EDTA-Lösung dar. EDTA komplexiert Ni^{2+} -Ionen und löst diese von der NTA-Matrix und damit auch die gebundenen Proteine. Doch auch der Einsatz eines NiNTA-Elutionspuffers mit einer 200 mM EDTA-Konzentration erbrachte keine höheren Ausbeuten während des Elutionsprozesses. Somit muß davon ausgegangen werden, daß nicht mehr Cx43-Moleküle an die NiNTA-Matrix gebunden sind, als die nach dem Elutionsschritt vorgefundenen. Es muß vermutet werden, daß die Bindung der Cx43-Halbkanäle an die NiNTA nicht quantitativ stattfindet.

Die eingesetzte Ni-NTA-Säulenkapazität wurde so gewählt, daß sie die eingesetzte Cx43-Menge sechsfach übertraf. Der Einsatz noch größerer Mengen an NiNTA-Matrix und damit eine Erhöhung der möglichen Bindungsstellen für 6xHis-markierte Proteine, führt zu keiner Erhöhung der Cx43-Menge im Eluat.

Einzig die Denaturierung der Cx43-Moleküle mit 6 M GuHCl erbrachte eine wesentliche Steigerung der eluierten Cx43-Menge. Abb. 3.9. zeigt den Vergleich einer nativen Aufreinigung mit einer denaturierenden Aufreinigung. Bei Auftrag gleicher Eluatsvolumina ist die Eluatsbande einer denaturierenden Aufreinigung von größerer Intensität als die Eluatsbande der nativen Aufreinigung.

Abb. 3.9.: SDS-PAGE (12 %) mit anschließendem Western Blot einer NiNTA-Aufreinigung von Cx43 unter nativen Bedingungen (linke Spur) sowie unter denaturierenden Bedingungen (rechte Spur), wobei bei gleichen Elutionsvolumen gleich volumige Aliquots aufgetragen wurden. Das 6xHis markierte Cx43 bindet unter denaturierenden Bedingungen wesentlich besser als unter nativen Bedingungen. Die Zahlen am linken Rand besitzen die Einheit kD. Der Western Blot wurde mit einem HRP konjugierten mk Anti-V5 Antikörper durchgeführt.



Da strukturelle Untersuchungen mittels der ESR-Spektroskopie an intakten Cx43-Halbkanälen unternommen werden sollen, stellt eine Denaturierung der Cx43-Halbkanäle keine adäquate Vorgehensweise dar. Ist das Hexamer in seine einzelnen monomeren Bestandteile zerfallen, so ist bisher keine Methode bekannt, den Halbkanal aus einzelnen Cx-Molekülen zu rekonstituieren.

Aus den hier dargelegten Ergebnissen läßt sich schließen, daß das C-terminale His-Epitop, unter nativen Bedingungen nicht frei zugänglich ist. Daraus resultierte die unzureichende Bindung der Halbkanäle an die NiNTA-Matrix. Eine Isolation von Cx43-6xHis in der Form von Halbkanälen

über Nickelchelatsäulen ist demnach in einer für die ESR-Spektroskopie notwendigen Quantität nicht möglich.

3.3.2. Zweischnitt-Gelfiltration zur Aufreinigung von Cx43-Halbkanälen

Die im folgenden dargestellte Trennmethode erreicht eine vergleichbare Reinheit wie die Immunoaffinitätschromatographie (Loo et al., 1995, Rhee et al., 1996), jedoch werden keine Reaktionsschritte benötigt, die eine Denaturierung des Proteins zur Folge haben könnten.

In einem ersten Aufreinigungsschritt wurden wie für die Ni-NTA-Affinitätschromatographie Cx43-Halbkanäle aus transfizierten High Five Insektenzellen mittels des nichtionischen Detergenzes 8-POE solubilisiert. Die so erhaltene Lösung besteht aus den interessierenden Cx43-Halbkanälen sowie einer großen Zahl weiterer solubilisierter Membranproteine. Das Abtrennen dieser nicht-Cx-Proteine geschah in zwei Gelfiltrationsschritten. Der erste Schritt diente dazu, den größten Teil der Fremdproteine abzutrennen. Hierzu wurde eine bereits bekannte Eigenschaft der Cx-Halbkanäle benutzt. Nach Entfernung des Detergenzes aus Lösungen solubilisierter Halbkanäle aggregieren diese zu größeren Strukturen. Kistler *et al.* (1994), zeigten, daß sich die Connexone lateral zueinander anordnen und eine flächige Struktur bilden.

Diese Halbkanalaggregate besitzen eine der Anzahl der Halbkanäle entsprechend größere molekulare Masse als einzelne Halbkanäle. In einer Gelfiltrationschromatographie, die Proteine aufgrund ihrer molekularen Masse trennt (Abb. 3.10.), ist von Halbkanalaggregaten ein anderes Laufverhalten zu erwarten als von einzelnen Halbkanälen.

Abb. 3.11. in Verbindung mit Abb. 3.12. a) zeigt, daß Halbkanalaggregate tatsächlich ein so große molekulare Masse besitzen, daß sie im oder nahe dem Ausschlußvolumen ($k' = 0$) der hier eingesetzten Gelfiltrationsmatrix Superose 6 PG (Pharmacia) zu finden sind. Die Abbildung gibt das photometrische Elutionsprofil einer Cx43 haltigen Lösung wieder. Die Lösung wurde durch die Solubilisierung von transfizierten, Cx43 exprimierenden High Five Insektenzellen hergestellt. Vor der Gelfiltration wurde das Detergenz 8-POE aus dieser Lösung entfernt, indem die Probe gegen Puffer dialysiert wurde (nach Kistler *et al.*, 1994). Während dieses Dialyseprozesses tritt der gewünschte Aggregationseffekt ein. Die Cx43-Halbkanäle bilden Halbkanalaggregate, die bei der anschließenden Gelfiltration im Bereich des Ausschlußvolumens zu finden sind. Einen ersten Hinweis darauf liefert die mitgeführte Kontrolle. Hier wurden nicht transfizierte, also Cx43 nicht exprimierende High Five Insektenzellen, der gleichen Solubilisierungs- und Dialyseprozedur unterworfen. Die so erhaltene Lösung wurde ebenfalls einer Gelfiltration unterzogen und das photometrische Elutionsprofil aufgezeichnet. Die Cx43-haltige und Cx43-freie Proben wurden zeitgleich den jeweiligen Prozeduren unterworfen, zur Solubilisierung der Membranproteine stand jeweils die gleiche Anzahl von Insektenzellen zur Verfügung.

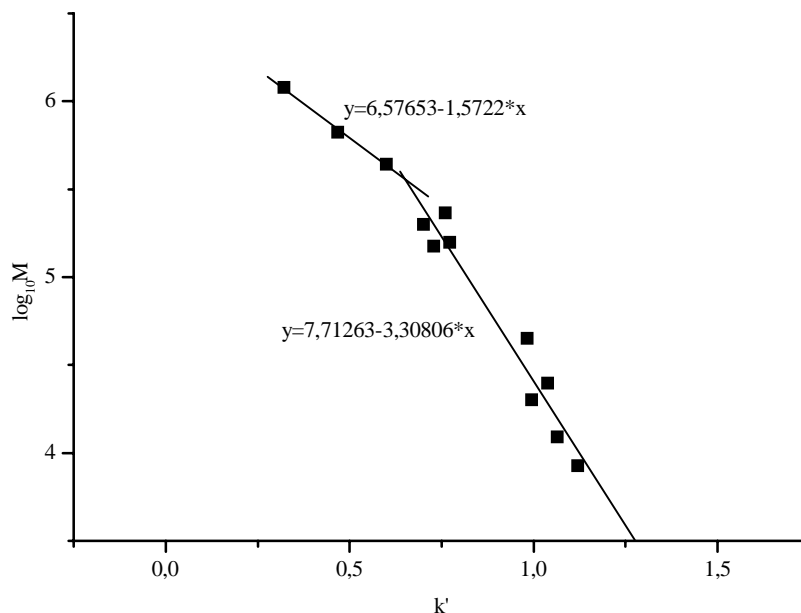


Abb. 3.10.: Eichgerade: Eine Superose 6 PG Säule wurde mit den folgenden Standards geeicht: Kinase (1200 kd), Thyreoglobulin (668 kd), Ferritin (440 kd), Aldolase (158 kd), α -Amylase (200 kd), Katalase (232 kd), IgG (150 kd), Ovalbumin (45 kd), Chymotrypsinogen (25 kd), Trypsininhibitor (20 kd), Cytochrom c (12,4 kd), Ubiquitin (8,5 kd) (Punkte und Regressionsgeraden, linke Ordinatenachse. Der Laufpuffer setzte sich aus 50 mM NaP_i, 300 mM NaCl bei einem pH-Wert von 8.0 zusammen. In Abhängigkeit von der Aufgabenstellung enthielt der Laufpuffer 1% (w/v) Detergenz. Die Flußrate betrug 8 ml/h, das Fraktionsvolumen beträgt 1 ml. Die Abzisse ist durch den Kapazitätsfaktor k' als $(V_e - V_0)/V_0$ definiert, wobei V_e das Elutionsvolumen und V_0 das Ausschlußvolumen darstellen. V_0 entspricht dem Elutionsvolumen des Dextranblau (2000 kd).

Das Vorhandensein von Cx43-Halbkanalaggregaten zeigt sich an der erhöhten Extinktion der Cx43-haltigen Probe im Bereich des Ausschlußvolumens ($k' = 0$). Die Extinktion der Cx43-haltigen Probe weist eine erhebliche Abweichung von der Cx43-freien Kontrolle auf. Im weiteren Elutionsverlauf zeigen beide Proben ein identisches Elutionsprofil. Dies deutet darauf hin, daß keine größeren photometrisch detektierbaren Mengen von beispielsweise monomeren Cx43-Molekülen in der Cx43-haltigen Probe auftreten. Aus der Extinktionsdifferenz zwischen der Cx43-haltigen Probe und der Kontrolle konnte nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung auf die synthetisierte Cx-Menge geschlossen werden. Sie lag in der Größenordnung von 10 mg Cx43 pro Liter Schüttelkultur.

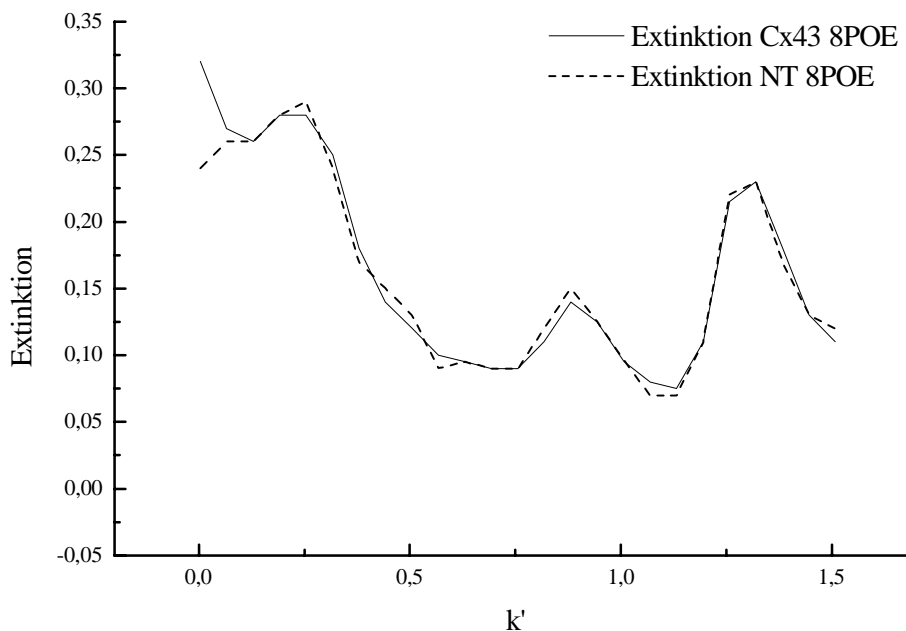


Abb. 3.11.: Erste Gelfiltration der Cx43 haltigen Proben und der Kontrolle nicht transfizierter High Five Zellen. Deutlich ist der Unterschied im Proteingehalt im Bereich des Ausschlußvolumen bei $k' \geq 0$ zu sehen. Die Extinktion wurde bei $\lambda = 280$ nm gemessen.

Abb. 3.12. a) zeigt den Cx43-spezifischen Elutionsverlauf. Aliquots gleicher Volumina der Elutionsfraktionen wurden einem Dot-Blot unterzogen. Cx43-Moleküle wurden durch HRP gekoppelte Antikörper markiert, die eine photographisch nachweisbare Chemolumineszenz vermittelten. Die densitometrische Bestimmung der auf einem lichtempfindlichen Film abgebildeten „Dots“ erlaubt Aussagen über den relativen Gehalt von Cx43 im Elutionsverlauf, wobei der Gehalt an Cx43 einzelner Fraktionen sich immer auf die Fraktion mit maximaler Cx43-Konzentration bezieht. Wie 3.12. a) verdeutlicht, ist die maximale Cx43-Konzentration im Bereich des Ausschlußvolumens zu finden. Im weiteren Elutionsverlauf nimmt der relative Cx43-Gehalt stark ab. Die nicht transfizierte Insektenzellkontrolle zeigt erwartungsgemäß kein Cx43-spezifisches Signal.

Die Proteinkonzentration der das Ausschlußvolumen definierenden Fraktion bei $k' = 0$ wurde bestimmt. Die Fraktion mit der maximalen Cx43-Konzentration ($k' = 0$) weist mit $630 \mu\text{g/ml}$ einen nahezu doppelt so hohen Proteingehalt wie die vergleichbare Cx43-freie Fraktion der Kontrolle auf. Dieses Ergebnis zeigt allerdings auch, daß etwa 50 % der in dieser Fraktion gelösten Proteine als Fremdproteine anzusehen sind. Diese Fremdproteine sind im zweiten Gelfiltrationsschritt zu entfernen.

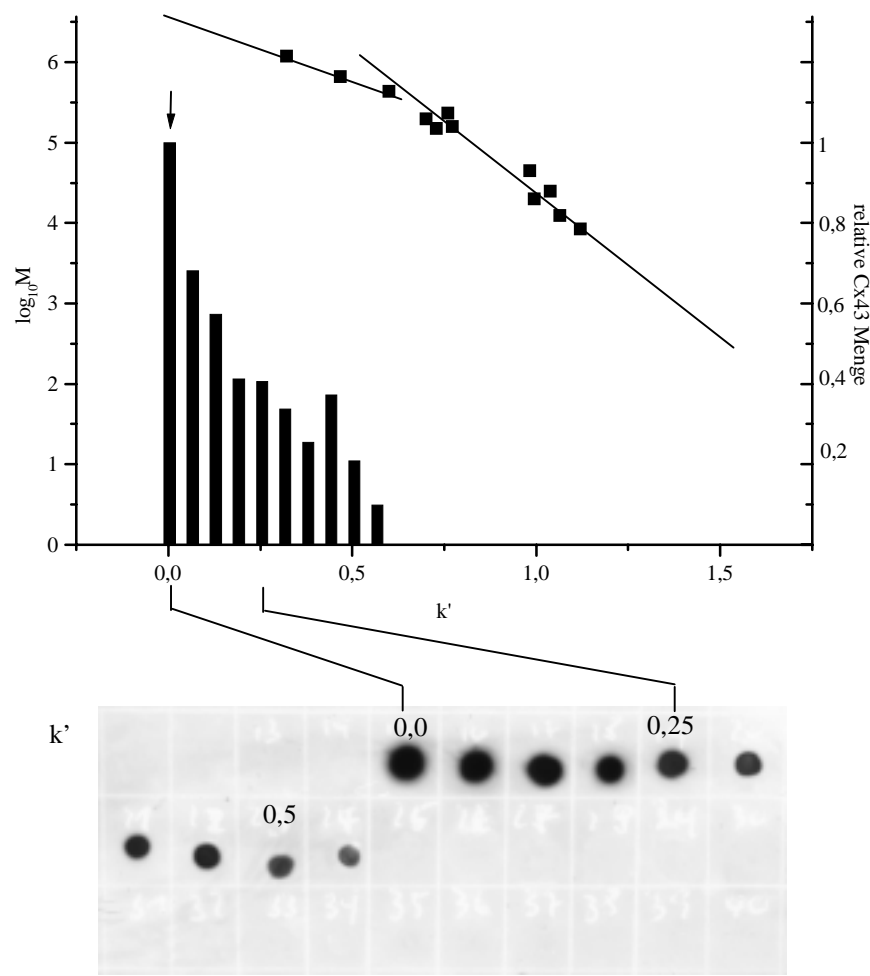
Die Fraktion mit der maximalen Cx43-Konzentration sowie die vergleichbare Kontrollfraktion wurden mit dem Methanthiosulfonatspinlabel (MTSSL) spinmarkiert. In diesem Schritt werden sowohl die freien Cysteingruppen tragenden Fremdproteine wie auch die Cx43-Halbkanalaggregate markiert. Durch die zweite Gelfiltration wird neben den spinmarkierten Fremdproteinen auch der nicht gebundene freie Spinlabel entfernt.

Im Anschluß an die Spinmarkierung wurden die Proben einer erneuten Detergenzbehandlung ausgesetzt. Das nichtionische Detergenz 8-GLU (8 % w/v) sollte aus den vorhandenen Cx43-Halbkanalaggregate wieder einzelne, mittlerweile spinmarkierte Cx43-Halbkanäle herauslösen. Diese 8-GLU solubilisierten, spinmarkierten Cx43-Halbkanäle besitzen eine wesentlich geringere molekulare Masse als die Halbkanalaggregate und sollten während der Gelfiltration über eine Superose 6 PG Matrix im Elutionsvolumen zu finden sein. Voraussetzung für eine effektive Aufreinigung im Sinne der ESR-Spektroskopie ist natürlich, daß alle spinmarkierten Fremdproteine ein anderes Gelfiltrationsverhalten zeigen, als die zu untersuchenden solubilisierten und spinmarkierten Cx43-Halbkanäle.

Abb. 3.12. b) zeigt den Cx43-spezifischen Elutionsverlauf. Deutlich ist im Vergleich zu Abb. 3.12. a) die Verschiebung eines großen Teils der Cx43-Proteine auf der Abzisse zu sehen. Neben einem Cx43-Konzentrationsmaximum im Ausschlußvolumen ($k' = 0$) ist nun ein Maximum bei $k' = 0,6$ zu finden. Aus der Eichgerade der Gelfiltrationssäule ist abzulesen, daß dieser Wert des Kapazitätsfaktors Proteinen mit einer molekularen Masse von 420 kd entspricht.

Für Connexinhalbkanäle wurde gezeigt, daß sie bei einem Solubilisierungsprozeß etwa 55 % ihrer eigenen Masse in Form des Detergenzes binden (Rhee *et al.*, 1996). Die hier untersuchten Cx-Halbkanäle setzen sich aus sechs homomeren Cx43-Untereinheiten zusammen, die jeweils ein 2 kd schweres V5-6xHis-Epitop tragen. Somit ist die Masse jeder Untereinheit 45 kd, die Masse eines daraus gebildeten Halbkanals beträgt 270 kd und damit die Masse eines solubilisierten Halbkanals 418,5 kd. Dieser rechnerische Wert für einen solubilisierten Cx43-Halbkanal stimmt sehr gut mit dem aus dem Elutionsprofil ermittelten Wert von 420 kd überein. Die Spinmarkierung der Cx43-Halbkanäle wird in diese Betrachtung nicht mit einbezogen, da die molekulare Masse eines MTSSL-Moleküls bei 246 Da liegt und diese minimale zusätzliche Masse von der eingesetzten Gelfiltrationssäule nicht aufgelöst wird.

a)



b)

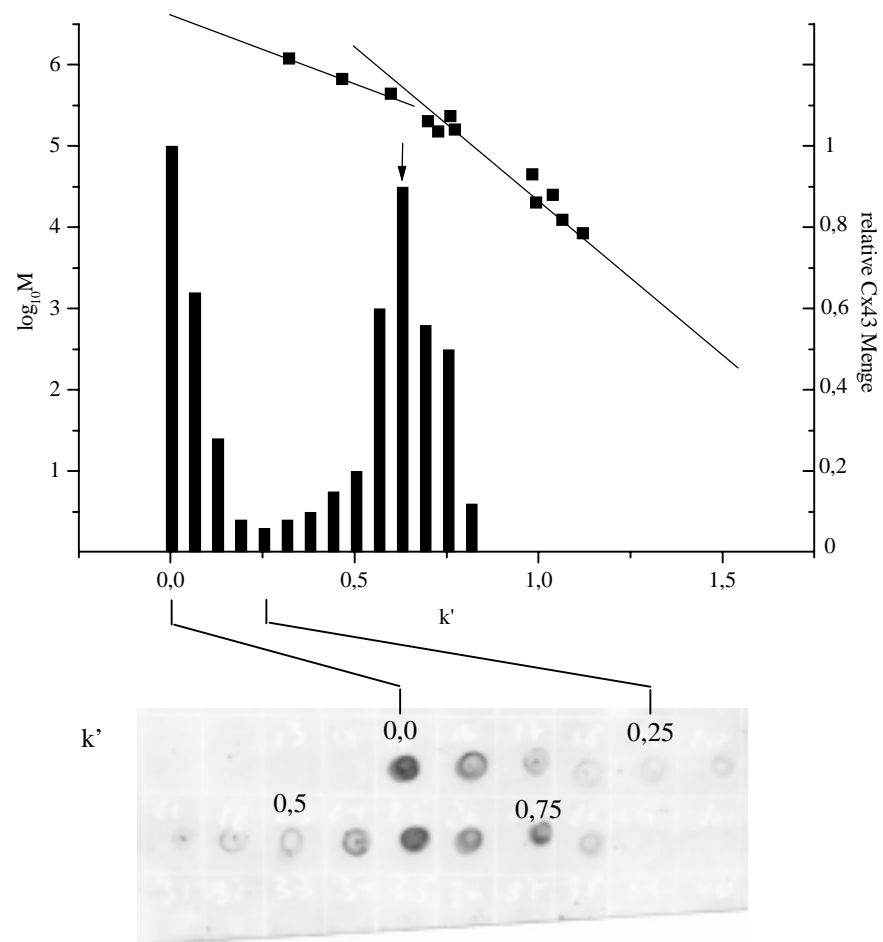


Abb. 3.12.: Gelfiltration detergentbehandelter Cx43. Detergentbehandelte Connexine wurden auf die Säule aufgetragen und im Eluat durch eine Dot Blot Densitometrie quantitativ nachgewiesen (rechte Ordinate). a) Cx43 nach 8-POE Solubilisierung und anschließender Dialyse. Große Aggregation von Cx43 sind im Bereich des Ausschlußvolumens der Gelfiltrationssäule nachweisbar. Der Pfeil markiert die Fraktion, die einer zweiten Detergenzbehandlung mit 8-GLU unterzogen wurde. b) Cx43 nach der zweiten Detergenzbehandlung mit 8-GLU. Die Fraktion mit der höchsten Cx43 Konzentration ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Durch die Eichgerade läßt sich für Connexine dieser Fraktion eine Molekularemasse von 420 kd ermitteln. Dieser Wert entspricht sehr gut der Molekularenmasse eines Halbkanals der zusätzlich 55 % seiner Eigenmasse in Form von Detergenzmolekülen trägt. Es konnte kein monomeres Cx43 nachgewiesen werden. Der Dot Blot wurde mit einem HRP konjugierten mk Anti-V5 Antikörper durchgeführt.

Das Detergenz 8-GLU kann demnach aus Cx43-Halbkanalaggregaten Cx43-Halbkanäle lösen. Dieser Solubilisierungsprozeß ist, wie die Abb. 3.12. b) zeigt, nicht vollständig. Ein nahezu gleicher Anteil der Cx43-Proteine bleibt unter den gewählten Bedingungen in Form von Halbkanalaggregaten. Die zwischen dem Ausschlußvolumen ($k' = 0$) und dem Elutionsmaximum bei $k' = 0,6$ liegenden Fraktionen zeigen geringe Konzentrationen von Cx43, ebenso sind geringe Cx43-Konzentrationen in den Fraktion bis $k' = 0,8$ zu finden. Die von Rhoo *et al.* (1996) durchgeführte Größenbestimmung von immunoaffinitätschromatographisch aufgereinigten Halbkanälen zeigt in einer Gelfiltration eine ähnliche Verteilung um das Halbkanalmaximum. Die

Autoren vermuten, daß möglicherweise auch pentamere oder septamere Halbkanäle aufgetrennt werden.

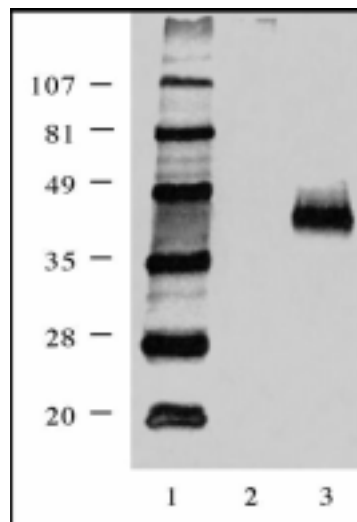
Abb. 3.12. b) veranschaulicht, daß keine monomeren Cx-Moleküle, die bei $k' = 1,1$ vorzufinden wären, auftreten. Dies deckt sich mit dem Befund von Rhoo *et al.*, 1996.

Abb. 3.13. verdeutlicht die Aufreinigung von Cx-Halbkanälen durch die Zweischnitt-Gelfiltration. Der Vergleich der Cx-haltigen Fraktionen bei $k' = 0,1$ mit der entsprechenden Fraktion nicht transfizierter Kontrollzellen zeigt noch keine spezifische Cx43-Bande. Nach der zweiten Gelfiltration ist in der interessierende Gelfiltrationsfraktion bei $k' = 0,6$ ausschließlich Cx43 vorzufinden, während in der mitgeführten Kontrolle der nicht transfizierten Zellen in dieser Fraktion kein Protein nachzuweisen ist.

Die Cx-haltigen Probe bei $k' = 0,6$ wie auch die entsprechende Cx-freie Kontrolle wurden durch Ultrafiltration (MWCO = 100 kd) um einen Faktor 10 aufkonzentriert.

Eine Proteinkonzentrationsbestimmung der aufkonzentrierten Proben ergab für die Cx-haltige Probe einen Wert von $0,96 \mu\text{M}$ Cx43, die Kontrolle zeigte keine meßbare Proteinkonzentration.

Abb. 3.13.: SDS-PAGE (12 %) mit anschließender Silberfärbung: Spur 1: Markerproteine, Spur 2: Kontrolle aus nicht transfizierten Zellen nach der zweiten Gelfiltration bei $k' = 0,6$, Spur 3: Cx43 haltige Probe nach der zweiten Gelfiltration bei $k' = 0,6$. Während Cx43 nachweisbar ist, kann in der entsprechenden Kontrolle kein Protein nachgewiesen werden. Die Zahlen am linken Rand besitzen die Einheit kD.



3.4. ESR-Spektroskopie

Für die Cx-haltige Probe und ihre Kontrolle wurden im ESR-Spektrometer jeweils ein cw-Spektrum bei Raumtemperatur gemessen. Aus dem in Abb. 3.14. a) wiedergegebenen Spektrum läßt sich die Konzentration der Spinlabelmoleküle, die dieses Spektrum erzeugen, mittels einer Spinzahlbestimmung zu $c_{\text{ESR}} = 3.135 \mu\text{M}$ errechnen. Die Proteinkonzentration der gleichen Probe wurde parallel mit $0.964 \mu\text{M}$ bestimmt. Wird die Konzentration dieser Spinlabelmoleküle, die an die freien Cysteinreste des Cx43 gebunden sind, in Relation zur Konzentration der in der Probe befindlichen Cx43-Moleküle gesetzt, so ergibt sich die Anzahl der pro Cx43-Molekül gebundenen Spinlabelmoleküle. Eine solche Berechnung ergab, daß pro Cx43-Molekül 3.25 Spinlabelmoleküle gebunden werden.

Die Kontrollprobe zeigte kein ESR-spezifisches Signal. Dies steht im Einklang mit den Befunden der Proteinkonzentrationsbestimmung und SDS-PAGE-Auftrennung der Proben. Hier waren keine Fremdproteine nachweisbar.

Abb. 3.14 c) zeigt das Spektrum einer nach dem geschilderten Isolationsverfahren reproduzierten Cx43-Probe. Die Cx43-ESR-Spektren aus Abb. 3.14 a) und c) stimmen überein.

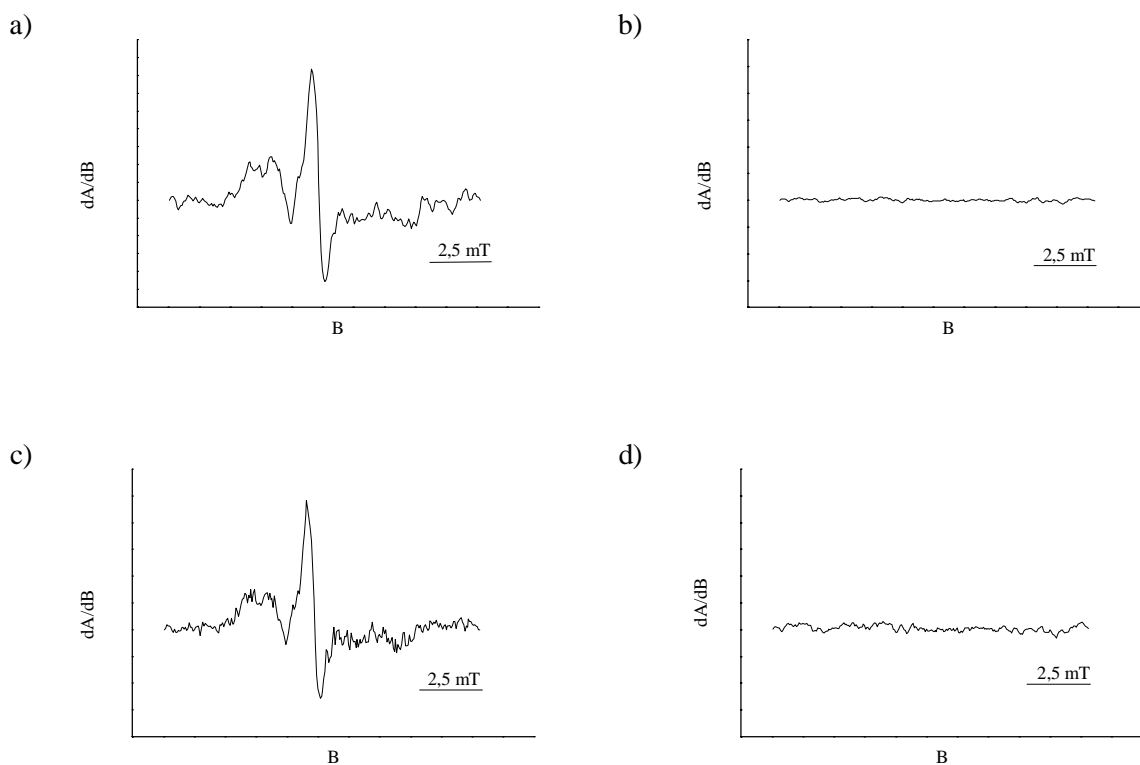


Abb. 3.14.: ESR-Spektren a) und b) der aufgereinigten Cx43-Proben sowie ihrer entsprechenden Kontrollen aus nicht transfizierten High Five Insektenzellen c) und d). Das Cx43 Wildtypprotein verursacht ein deutliches auf freie Cysteinreste zurückzuführendes Signal. Die Kontrollen zeigen außer einem Rauschen kein Signal.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen einen praktikablen Weg zur Expression und Aufreinigung einer für die ESR-Spektroskopie ausreichenden Menge spinmarkierter Cx43-Halbkanäle. Die durchgeführte ortsspezifische Mutagenese, die für das ortsspezifische Spinlabeln von Proteinen

notwendig ist, belegt, daß ein gezieltes Cysteinscreening zur Strukturaufklärung des Cx43-Halbkanals hiermit möglich ist.

4. Diskussion

4.1. Expressionssysteme

4.1.1. Expression von Connexinen in Insektenzellen

Die konstitutive Expression eines Connexingenes in stabil transfizierten Insektenzellen konnte in dieser Arbeit erstmalig für Cx43 durchgeführt werden. Bisher war nur die transiente Expression eines Connexingenes durch die Baculovirus vermittelte Infektion von Insektenzellen möglich. Den Vorteilen des Insektenzellsystems standen gravierende Nachteile bei der Infektion durch ein Baculovirus gegenüber.

Zu den Vorzügen des Insektenzellsystems zählt die postrtranslationale Modifikation eukaryonter Proteine. So zeigt Cx43, das mittels der Baculovirusmethode transient in Insektenzellen exprimiert wurde, Serin-Phosphorylierungen, die denen aus Säugerzellen entspricht (Loo *et al.*, 1995). Speziell für die Untersuchung von Connexinen bietet das Insektenzellsystem den oft wünschenswerten Umstand, daß dieses Expressionssystem nicht für Connexin codiert. Weiterhin bieten Insektenzellen die Möglichkeit zur Anlage von Schüttelkulturen im Litermaßstab, um das interessierende Protein in ausreichender Menge exprimieren zu können.

Werden Insektenzellen nun mit rekombinanten Baculoviren infiziert, so ist die Lyse der Zellen unumgänglich. Für die immer wieder notwendig werdende Neuinfektion von Insektenzellen ist eine intensive Betreuung der dazu benötigten Baculoviren erforderlich. Der weitaus größte Nachteil des Baculovirus-Expressionssystems besteht allerdings in einer viral codierten Peptidase (Grosch *et al.*, 1998), die zu einer ungewollten Spaltung des synthetisierten Proteins führt. So sind Cx32-Halbkkanäle, die mittels des Baculovirus-Expressionssystems gewonnen werden, nicht von ausreichender Homogenität. Sie eignen sich nicht zur Rekonstitution von 2D-Kristallen solcher Qualität, daß sie für hochauflösende Kryo-Elektronen-Mikroskopie geeignet sind (Unger *et al.*, 1999 b).

Wird der Struktur-Funktionszusammenhang eines Proteins untersucht, so ist die Integrität des Proteins eine notwendige Bedingung. Die Transfektion von Insektenzellen mit einem dafür geeigneten Expressionsplasmid (Jarvis *et al.*, 1996; Hegedus *et al.*, 1998) erlaubt die Vorteile des Insektenzellsystems zu nutzen ohne Gefahr zu laufen, das interessierende Protein durch eine viral codierte Peptidase zu degradieren. Zusätzlich bietet die stabile Transfektion von Insektenzellen den Vorteil der konstitutiven Expression des interessierenden Plasmids über einen langen Zeitraum.

4.1.1.1. Exprimierte Proteinmenge

Die ESR-spektroskopische Untersuchung von Proteinen verlangt aufgrund ihrer physikalischen Gegebenheiten eine Masse der Cx43-Probe in der Größenordnung von 250 ng. Dies entspricht der Masse, die für eine schwache Bande in einem Coomassie-gefärbten SDS-PAGE Gel notwendig ist. Andere spektroskopische Methoden zur Struktur- und Funktionsaufklärung, wie beispielsweise die FTIR- oder die Raman-Spektroskopie benötigen weitaus größere Stoffmengen als die ESR-

Spektroskopie. Doch obwohl die ESR-Spektroskopie mit vergleichsweise geringen Stoffmengen auskommt, besteht für Connexine das Problem, daß sie als integrale Membranproteine mit einer übergeordneten polymeren Aggregation nur ein schwaches Expressionsniveau aufweisen (Unger *et al.*, 1999 b).

Das Baculovirus-Expressionssystem erlaubt die für ESR-Spektroskopie ausreichende Synthese von 2 mg Cx32 pro Liter Zellkultur (Stauffer *et al.*, 1991). Die hier erstmals durchgeführte stabile Transfektion von Insektenzellen erreicht für das Cx43-Protein 10 mg pro Liter Zellkultur. Somit stellt die stabile Transfektion der Insektenzellen mit Cx43 ein geeignetes System dar, um die für spektroskopische Zwecke notwendige Stoffmenge zu synthetisieren. Dies gilt insbesondere unter der Voraussetzung, die für nahezu alle spektroskopischen Verfahren gilt, geeignete Aufreinigungsschritte durchführen zu können. Bei der Aufreinigung von Proteinen sind immer Stoffmengenverluste hinzunehmen.

Die stabile Transfektion von Insektenzellen eignet sich, wie hier gezeigt, zur Herstellung der für die ESR-Spektroskopie benötigten Cysteinmutanten. Da die immerwieder notwendige Erzeugung rekombinanter Baculoviren entfällt, beschleunigt die Expression unterschiedlicher Cysteinmutanten durch stabil transfizierte Insektenzellen das in der ESR-Spektroskopie genutzte „Cysteinscreening“. Hierbei werden aufeinanderfolgende Proteinpositionen sukzessive durch Cysteinreste ersetzt, um durch ESR-spektroskopische Verfahren Informationen über die Struktur und Funktion des Proteins zu gewinnen.

4.1.1.2. Lokalisation der Connexine in der Zelle

Die hier gezeigten Ergebnisse für die Lokalisation des Cx43 in stabil transfizierten High Five Insektenzellen stimmen mit den Ergebnissen für transient Baculovirus-infizierte Sf9 Zellen überein (Loo *et al.*, 1995). Der Großteil des Connexins befindet sich in der Plasmamembran, nur ein geringer Anteil der Connexine ist im endoplasmatischen Reticulum anzutreffen. Nicht transfizierte Insektenzellen zeigen keine Expression eines durch den benutzten Antikörper nachweisbaren Cx43-Gens.

Auch BHK Zellen, die mit der kompletten Cx43-cDNA oder der um 119 Aminosäure C-terminal verkürzten Deletionsmutante Cx43-263T cDNA transfiziert wurden, zeigen in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie, daß das Antigen sowohl an der Zelloberfläche wie auch im Zellinnenraum anzutreffen ist. Die Fluoreszenz an der Zelloberfläche deutet bei BHK Zellen auf eine Aggregation der rekombinanten Proteine zu Gap Junction Plaques hin (Unger *et al.* 1999 b). Die immunhistochemischen Untersuchungen der mit der Cx43-cDNA oder Cx43-M1-cDNA stabil transfizierten High Five Insektenzellen zeigen ein ähnliches Bild wie das von Unger *et al.* (1999 b) für BHK Zellen beschriebene. In den High Five Insektenzellen ist das rekombinante Protein sowohl im Cytosol wie auch in der Zellmembran lokalisiert.

Somit kann davon ausgegangen werden, daß rekombinante Cx43- oder Cx43-M1-Proteine in High Five Insektenzellen zu Gap Junctions aggregierten. Das C-terminale V5-6xHis-Epitop nimmt demnach keinen Einfluß auf die Lokalisation der Cx43-Proteine. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Bukauskas *et al.* (2000) überein, die Cx43 C-terminal mit EGFP fusionierten und in HeLa-Zellen zur Expression brachten.

Die Expression eines Cx-Gens, in diesem Fall Cx46, das N-terminal ein 6xHis-Epitop trägt, scheiterte sowohl in Insektenzellen wie auch in HeLa-Zellen. Die Expression von wt-Cx46, das N-terminal nicht mit einem Petid fusioniert war, ist für HeLa-Zellen in der Literatur allerdings einmal beschrieben und damit möglich (Koval *et al.*, 1997). Es ist zu vermuten, daß das N-terminale 6xHis-Epitop den Mechanismus des Öffnen und Schließens des Halbkanals beeinflusst. Zum einen ist bekannt, daß endogene sowie heterolog exprimierte Halbkanäle unterschiedlicher Cx-Typen in der Plasmamembran öffnen können. Dies wird durch eine Erniedrigung der extrazellulären Kalziumkonzentration oder durch lange depolarisierende Spannungen verursacht (Paul *et al.*, 1991; Ebihara and Steiner, 1993; Gupta *et al.*, 1994, Ebihara *et al.*, 1995; Trexler *et al.*, 1996). N-terminal befindliche geladene Aminosäurereste sind für die spannungsempfindliche Regulation des Öffnen und Schließens von Gap Junction Kanälen verantwortlich (Verselis *et al.*, 1994, White *et al.*, 1995). Das N-terminale 6xHis-Epitop könnte durch die Wechselwirkung mit zweiwertigen Ionen des Mediums oder durch die Interaktion mit N-terminalen Aminosäureresten die Offenwahrscheinlichkeit eines Halbkanals erhöhen. Möglich ist auch eine sterische Störung des Halbkanals durch das insgesamt 26 Aminosäurereste umfassende N-terminale His-Peptid. Bukauskas (persönliche Kommunikation) berichtet, daß die Expression von N-terminal mit EGFP fusioniertem Cx43 in HeLa-Zellen nicht gelang. Sollte die Offenwahrscheinlichkeit des 6xHis-Cx46-Halbkanals in einer infizierten Insektenzelle stark erhöht sein, so würde die Zellmembran ihre Funktion als Diffusionsbarriere zwischen Intrazellular- und Extrazellularraum verlieren. Als Folge treten physiologisch unkontrollierte Diffusionsströme in die Zelle hinein sowie aus der Zelle heraus auf. Die Homöostase der Zelle wird in diesem Fall so stark gestört, daß die Zelle abstirbt. Damit besäße 6xHis-Cx46 für Insektenzellen eine cytotoxische Wirkung.

4.1.2. Isolation von Connexinen aus Geweben

Verschiedene Gewebe der Säugetiere exprimieren Connexine sehr stark. So sind das Herz (Beyer *et al.*, 1987) und die Deizidua (Winterhager *et al.*, 1993) Organe, die eine sehr starke Cx43 Expression besitzen. Die Leber der Maus hingegen coexprimiert in hohem Maße Cx26 und Cx32 (Finbow *et al.*, 1980; Paul, 1986). Für ESR-spektroskopische Untersuchungen zur Strukturaufklärung von Proteinen ist das Cysteinscreening unerlässlich. Dies bedeutet, daß neben einem hohen Expressionsniveau das benutzte Expressionssystem auch die Möglichkeit zur Herstellung mutagenisierter Proteine, bei denen Aminosäuren des wt-Proteins gegen Cysteine ausgetauscht werden, bieten muß. Die aus Geweben isolierten Cx sind wt-Proteine.

Gleiches gilt für einige sekundäre Zelllinien, die ebenfalls bestimmte Connexingene stark exprimieren, wie beispielsweise die Cx43 Expression in HRP-1 Zellen (Grummer *et al.*, 1996). Sie bieten den Vorteil der starken Expression, jedoch können diese Zelllinien nur für die Isolation von wt-Connexinen genutzt werden.

4.1.3. *In vitro* Translationssysteme

Die zellfreie Synthese von Connexinen, die Translokation in mircrosomale Membranen sowie die abschließende Aggregation zu Connexonen ist möglich. Das in Abb. 3.1. gezeigte Profil einer Dichtegradientenzentrifugation stimmt mit den von Falk *et al.* (1997) publizierten Profilen für monomere Connexine und hexamere Connexone überein.

Die Stoffmenge der synthetisierten Connexine ist allerdings bei den im µl-Maßstab durchgeführten Versuchsreihen so gering, daß der daraus folgende notwendige ml-Maßstab der Reaktionsansätze zum momentanen Zeitpunkt wirtschaftlich nicht durchführbar ist.

Microsomale Membranen enthalten nativ bereits eine Vielzahl von Proteinen (Falk *et al.*, 1997), so daß *in vitro* synthetisierte Connexinproteine einer Aufreinigungsprozedur unterworfen werden müßten. Solche Isolationsverfahren sind immer mit Proteinverlusten verbunden. Dies erhöht den Bedarf an *in vitro* synthetisiertem Protein.

Von besonderem Interesse ist die zellfreie Synthese von Proteinen für die ESR-Spektroskopie allerdings, da sie eine Möglichkeit darstellt, Strukturuntersuchungen von Proteinen ohne die kovalente Kopplung eines Spinlabelmoleküls an einen Cysteinrest durchzuführen. Cornish *et al.*, 1993, zeigten, daß der Einbau radikalischer Aminosäurereste in die Polypeptidkette des T4-Lysozyms schon während der Translation möglich ist. Nonsensemutationen werden von Suppressor-tRNAs, die eine aktivierte radikalische Aminosäure tragen, erkannt, die radikalische Aminosäure wird in die Polypeptidkette eingebaut. Diese radikalischen Aminosäuren sind in ihrem molekularen Volumen bedeutend kleiner als ein Spinlabel, der kovalent mit einem Cysteinrest verknüpft ist. Der Vorteil einer solchen Verfahrensweise besteht zum einen in der geringeren Invasivität der Proteinmodifikation für ESR-spektroskopische Zwecke, zum anderen würde die aufwendige und verlustreiche Trennung des interessierenden Proteins von der Gesamtheit aller anderen Proteine entfallen. Das interessierende Protein ist in diesem Fall bereits spinmarkiert, die Cysteinreste aller anderen Proteine sind aufgrund des Verzichts auf kovalent bindende Spinlabel ohne Bedeutung.

Einen weiteren wichtigen Aspekt für die Expression von Connexinen in einem zellfreien System behandelt die Arbeit von Falk *et al.* (1997). Sie untersuchen ausführlich die als Artefakt bei diesem Verfahren auftretende proteolytische Spaltung des Connexinpolypeptids. Sie findet reproduzierbar im ersten extrazellulären Loopbereich der untersuchten Connexine statt. So zeigen sowohl Cx43 wie auch Cx46 diese Spaltung. Die Proteolyse tritt im zellfreien System erst nach Zugabe der microsomalen Membranen auf. Falk *et al.* (1997) vermuten eine membranständige Signalpeptidase als Ursache für diesen Effekt.

4.2. Isolationssysteme - Aufreinigung unter nicht denaturierenden Bedingungen

Für die Untersuchung der Struktur- und Funktionszusammenhänge eines Proteins ist die Aufreinigung, die keine irreversible Störung der Sekundär- und Tertiärstruktur zur Folge hat, eine notwendige Bedingung. Connexine gehen als integrale Membranproteine eine übergeordnete polymere Aggregation zu Halbkanälen oder Gap Junction Membrankanälen ein. Der Erhalt dieser quartären Strukturmerkmale während der Aufreinigungsprozedur ist ebenfalls essentiell.

Eine Extraktion der Connexine von einer Immunoaffinitätsmatrix bei einem pH-Wert von 4 (Rhee *et al.*, 1996) oder 2,5 (Loo *et al.*, 1995) muß als äußerst kritisch betrachtet werden. Diese niedrigen pH-Werte führen zu einer Reihe von Protonierungen verschiedener Aminosäurereste. Diese Aminosäurereste können bei neutralem pH-Wert in ihrer deprotonierten Form wichtige strukturelle Funktionen auf den Ebenen der Sekundär, Tertiär- und Quartärstruktur erfüllen. Werden diese Reste nun protoniert, kann es zu irreversiblen Verschiebungen im Aufbau des Proteins kommen. Auch hydrolytische Spaltungen des Peptidrückgrates sind bei so niedrigen pH-Werten möglich. Für das Connexinprotein liegen bisher keine Daten über die Abhängigkeit der Struktur von einer Absenkung des pH-Wertes vor. Allerdings ist bekannt, daß der hohe pH-Wert von 11 bei der Alkaliextraktion von Gap Junction Plaques zu irreversiblen strukturellen Änderung führt (Cascio *et al.*, 1990). Bei hohem pH-Wert werden eine Reihe von Aminosäureresten deprotoniert, was die beobachteten irreversiblen strukturellen Veränderungen verursachen kann. Auch wenn die Aufreinigung durch eine Immunoaffinitätschromatographie die bisher größte Reinheit der isolierten Halbkanäle gezeigt hat, erscheint dieses Verfahren aufgrund des notwendigen Elutionsschritts bei niedrigem pH-Wert als ungeeignet für die Struktur- und Funktionsaufklärung.

4.2.1. Aufreinigung durch Zellfraktionierung und Dichtegradientenzentrifugation

Die gebräuchteste Aufreinigungsmethode für Connexine stellt die Zellfraktionierung mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation dar (Goodenough *et al.*, 1972). Der zur Zellfraktionierung gehörende Extraktionsschritt kann entweder durch den Einsatz eines Detergenzes oder durch einen alkalischen pH-Wert bewerkstelligt werden.

Die Detergenzextraktionsmethode für Gap Junctions beruht auf der Beobachtung, daß Gap Junction-Komplexe einen relative Widerstand gegen die Löslichkeit in unpolaren Detergenzien

besitzen. Die biochemischen Wechselwirkungen, die diesen relativen Widerstand begründen, sind unbekannt. Es wird vermutet, daß es sich um nichtkovalente Bindungskräfte handelt, die die laterale Wechselwirkung zwischen Connexonen stabilisieren. Für die Detergenzextraktion von Gap Junction Kanälen werden ionische Detergenzien wie Laurylsarcosin oder Cholsäure benutzt. Dabei verursacht die Detergenzextraktionsmethode eine für die Kryo-Elektronenmikroskopie wünschenswerte Lipidextraktion aus den Gap Junction Plaques (Hertzberg, 1984).

Die Alkaliextraktionsmethode für Gap Junctions nutzt das Prinzip, daß integrale Membranproteine bei hohem pH-Wert nicht solubilisiert werden können (Steck, 1974, Hertzberg, 1984).

Vorteile der Alkaliextraktionsmethode nach Hertzberg (1984) im Vergleich zu der Detergenzextraktion sind der geringere Zeitaufwand und der höhere Ertrag an Gap Junction Proteinen. Durch die Verfügbarkeit größerer Mengen an Gap Junction Protein war es nach Einführung der Alkaliextraktionsmethode für Gap Junctions möglich, Antikörper gegen verschiedene Gap Junction Proteine herzustellen. Für Struktur- und Funktionsuntersuchungen nachteilig ist die der Alkaliextraktion immanente strukturelle Veränderung der Connexine. So sinkt der Gehalt an α -Helices der Connexine (Cascio *et al.*, 1990) von 50 % auf 40 % nach einer Behandlung mit dem für die Alkaliextraktion notwendigen pH-Wert von 11.

Die nach der Zellfraktionierung und Zuckergradientenaufreinigung von Gap Junctions durchgeführten coomassiegefärbten SDS-PAGE-Gele zeigen immer ein komplexes Profil mit einer Vielzahl von Banden (Beispiele: Henderson *et al.*, 1979; Nicholson *et al.*, 1981; 1983, Cascio *et al.*, 1990; Unger *et al.*, 1999 b). Die Vielzahl der Banden wird nicht ausschließlich auf Verunreinigung durch andere Proteine zurückgeführt, sondern auch auf während der Präparation gespaltenes Cx sowie die Tendenz der Cx in SDS unter Hitze zu aggregieren. Henderson *et al.* (1979) und Nicholson *et al.* (1981, 1983) versuchten nach einer Cx32-Isolation aus Rattenleberzellen die neben der eigentlichen Cx-Bande auftretenden zusätzlichen Banden zu identifizieren. Sie konnten eine Bande dem für Leberpräparationen typischen Kollagen zuweisen, während sie eine weitere Bande als Uricase identifizierten. Für die meisten zusätzlich auftretenden Banden gelang eine solche Zuordnung allerdings nicht.

Nicholson *et al.* (1983) diskutieren ausführlich die Detergenzextraktionsmethode für Gap Junctions aus Rattenlebern. Durch densitometrische Bestimmungen der SDS-Gele berechnen sie die Reinheit ihrer Präparation. Die maximal mögliche Reinheit ihrer detergenzextrahierten Gap Junctions geben sie mit $77 \% \pm 9 \%$ Gap Junction Proteinanteil an der Gesamtproteinmenge.

Cascio *et al.* (1990) versuchten die Reinheit von alkaliextrahierten (Hertzberg, 1984) Gap Junction Proteinen aus Rattenlebern zu bestimmen. Sie konnten die von Hertzberg publizierten Ergebnisse nicht reproduzieren und fanden in den SDS-PAGE Gelen immer eine Anzahl anderer zusätzlicher Banden. Die Autoren zeigten, daß die detergenzextrahierten Gap Junction Kanäle von größerer Reinheit waren als die alkaliextrahierten. Die densitometrischen Daten ihrer SDS-PAGE Gele

zeigen für alkaliextrahierte Gap Junctions einen Connexingehalt von etwa 60 % an der Gesamtproteinmenge.

Die von Unger *et al.* (1999 b) für die Elektronen-Kryo-Mikroskopie aufgereinigten Gap Junction Plaques aus transfizierten BHK Zellen wiesen ebenfalls nach wie vor sehr große Verunreinigungen durch Nicht-Gap-Junction Proteine auf. Sie erreichten nach ihren Angaben eine Reinheit, die der von üblichen Membranpreparationen aus Lebergewebe vergleichbar war (Sikerwar and Unwin, 1988). Durch Behandlung der Probe mit DHPC konnten Membranbestandteile, die keine Gap Junction Proteine enthielten, teilweise gelöst werden. Jedoch zeigten SDS Gele der aufgereinigten und angereicherten Gap Junctions eine Vielzahl unterschiedlicher Banden, wobei durch eine Coomassie-Färbung der Gele keine dem rekombinanten Cx43-263T Protein entsprechende Bande sichtbar gemacht werden konnte. Diese Verunreinigungen werden als Ursache für die Auflösungsgrenze angesehen, die nicht ausreichend ist, einzelne Aminosäurereste der Connexinpolypeptidkette zu identifizieren.

Einen weiteren Hinweis auf die Verunreinigung isolierter Gap Junction Plaques, stellt der Befund dar, daß die Immunisierung von Schafen mit Gap Junction Plaques, die durch die Alkaliextraktionsmethode gewonnen wurden, eine Antwort auf das Gap Junction Protein, wie auch auf eine ganze Reihe weiterer Membranproteine hervorruft (Cascio *et al.*, 1990).

Es bleibt der Schluß, daß die klassische Methode der Gap Junction Präparation durch Zellfraktionierung und Zuckerdichtegradientenzentrifugation keine effektive Isolation von Gap Junction Kanälen darstellt. Connexine stellen in der Probe nur einen Anteil an der Gesamtproteinmenge. Außerdem erfahren die Gap Junction Kanäle bei diesem klassischen Aufreinigungsansatz bei Anwendung der Alkaliextraktionsmethode eine Denaturierung.

Die Verunreinigungen der Plaques von über 20 % können das ESR-Spektrum aufgrund des Gehalts an freien Cysteinen der Nicht-Connexin-Proteine stark verfälschen. Ein ESR-Spektrum einer Probe, die ausschließlich die äquivalenten Verunreinigungen der Plaques enthält, könnte vom ESR-Spektrum der Gap Junction Plaques, die diese Verunreinigungen besitzen, subtrahiert werden. Das daraus resultierende Differenz-ESR-Spektrum wäre ausschließlich durch Connexinkomplexe verursacht.

Die Plaque-immanenten Verunreinigungen lassen sich jedoch nicht als Kontrollprobe, die keine Connexinmoleküle enthält, gewinnen, da die Connexinkomplexe die tragende Struktur der Gap Junction Plaques darstellen. Die Isolation einer Struktur ohne Connexinmoleküle, die die äquivalente Verunreinigungen besitzt, ist unmöglich. Die Isolation von Gap Junctions durch Zellfraktionierung und Dichtegradientenzentrifugation für die angestrebte ESR-spektroskopische Untersuchung von Connexonen oder Gap Junction Kanälen ist als alleiniger Aufreinigungsschritt aufgrund des hohen Verunreinigungsgrades, der sowohl der Alkaliextraktion wie auch der Detergenzextraktion eigen ist, nicht geeignet.

Eine weitere Aufreinigung von Connexinkomplexen aus Gap Junctions, die durch Zellfraktionierung und Dichtegradientenzentrifugation angereichert wurden, ist von Stauffer *et al.* (1991) und Buehler *et al.* (1995) erprobt worden. Beide setzten das nichtionische Detergenz 8-GLU zur Solubilisierung von Halbkanälen aus Gap Junction-Strukturen ein. Beide Autoren konnten nur unter alkalischen Bedingungen bei einem pH-Wert von 10 oder höher und unter Zusatz von DTT Halbkanalstrukturen aus den Gap Junction Plaques freisetzen. Auf die denaturierende Wirkung hoher pH-Werte haben Cascio *et al.* (1990) hingewiesen. DTT findet als Reduktionsmittel zur Spaltung von Disulfidbrücken eine häufige Anwendung und ist daher für die Isolation von Cx-Halbkanalstrukturen äußerst kritisch. Die für das Docking zweier Connexone essentiellen Disulfidbrücken (Foote *et al.*, 1998) der extrazellulären Loops werden durch DTT gespalten. Dies führt zwar einerseits zur Trennung der beiden Connexone, andererseits liegen die extrazellulären Loops nun nicht mehr in ihrer nativen Struktur vor. Erschwerend kommt hinzu, daß diese reduzierten Cysteinreste in der Lage sind, einen Spinlabel zu binden. Dieser Effekt könnte nur bei einer ESR-spektroskopischen Untersuchung der extrazellulären Loops von Interesse sein. Soll allerdings ein Cysteinscreening beispielsweise einer membranständigen α -Helix durchgeführt werden, erschweren zusätzliche freie Cysteingruppen die ESR-spektroskopische Untersuchung. Eine Solubilisierung von Halbkanälen aus zuvor angereicherten Gap Junctions scheidet aus den genannten Gründen aus.

Der in dieser Arbeit beschriebene Weg, Connexone mittels des Detergenzes 8-POE aus der Zellmembran zu isolieren, ermöglicht den Verzicht auf alkalische pH-Werte und benötigt nicht den Einsatz des Reduktionsmittels DTT.

4.2.2. Solubilisierung und Gelfiltration

Der Unterschied bei der Solubilisierung von Kanal- oder Halbkanalstrukturen einerseits und der Isolation von Gap Junction Plaques andererseits liegt in der Benutzung unterschiedlicher Detergenzien. So werden für die Isolation der Gap Junction Plaques bevorzugt ionische Detergenzien wie Laurylsarcosin oder Deoxycholsäure verwandt, während zur Gewinnung von Kanal- oder Halbkanalstrukturen nichtionische Detergenzien eingesetzt werden. Detergenz-Solubilisierungsmethoden beruhen auf der Löslichkeit von Cx durch nichtionische Detergenzien, während Gap Junction Plaques aufgrund ihrer Unlöslichkeit in ionischen Detergenzien oder hohem pH isoliert werden.

Nach der Behandlung mit einem nichtionischen Detergenz besteht das Membranrohextrakt aus solubilisierten assoziierten und integralen Membranproteinen, aus solubilisierten Membrankomplexen (z.B. Connexonen) sowie aus Lipiden. Bei den solubilisierten Komplexen kann es sich in Abhängigkeit vom gewählten nichtionischen Detergenz sowohl um Connexone wie auch um einzelne Gap Junction Kanäle handeln (Engel *et al.*, 1993). Die Wahl des nichtionischen Detergenzes ist daher von entscheidender Bedeutung. Da die Spezifität bestimmter Detergenzien

für bestimmte Proteinstrukturen bisher nicht verstanden ist, kann das geeignete Detergenz nur empirisch ermittelt werden. Kistler *et al.* (1994) zeigten eine gleich gute Effektivität unterschiedlicher nichtionischer Detergenzien für die Solubilisierung von Connexinkomplexen. Sie konnten belegen, daß die Verwendung verschiedener nichtionischer Detergenzien zur Isolation unterschiedlicher Connexinkomplexe führt. So werden durch die Verwendung von 8-POE ausschließlich Halbkanäle solubilisiert, während 8-GLU zusätzlich zur Solubilisierung ganzer Kanalstrukturen führt. Das Detergenz 8-POE besitzt eine größere Connexin-Selektivität als 8-GLU, denn es werden wesentlich weniger Nicht-Connexin-Proteine isoliert. Diese Befunde legten die Verwendung der Detergenzien 8-POE und 8-GLU für die hier durchgeführten Experimente nahe. Eine Beeinträchtigung der Funktionalität 8-GLU solubilisierten Halbkanäle konnten Rhee *et al.* (1996) nicht feststellen. Kistler *et al.* (1994) belegten auch, daß die Halbkanäle nach einer Dialyse gegen einen geeigneten Puffer sich lateral zu sogenannten Halbkanal-Blättern assoziieren.

Die in dieser Arbeit präsentierte 2-Schritt-Gelfiltration erlaubt die Isolation solubilisierter Cx43 in der Form von Connexonen. Dabei wird eine Reinheit der Connexinhalbkanäle erzielt, die der mittels Immunoaffinitätschromatographie isolierten Connexine gleichkommt (Loo *et al.*, 1995; Rhee *et al.*, 1996). Vor dem ersten Gelfiltrationschritt wurden die Befunde von Kistler *et al.* (1994) genutzt, Halbkanalstrukturen durch das nichtionische Detergenz 8-POE aus der Zellmembran zu solubilisieren, um sie im Anschluß daran durch eine Dialyse gegen einen detergenzfreien Puffer zu Halbkanal-Blättern zu aggregieren. Durch die erste Gelfiltration konnten diese Halbkanalaggregate eingengt werden und ein Großteil der Nicht-Connexin-Proteine abgetrennt werden.

Die Gelfiltration durch das Detergenz 8-GLU solubilisierter Cx-Halbkanäle mittels einer Superose 6 PG-Matrix als einen zweiten Schritt einer Aufreinigungsprozedur ist bereits von Buehler *et al.* (1995) erfolgreich durchgeführt worden. Die Connexinkomplexe wurden hier vor der Gelfiltration allerdings aus Gap Junction Plaques, die mittels Zellfraktionierung und Dichtegradientenzentrifugation angereichert wurden, durch einen hohen pH-Wert sowie unter Einsatz von DTT solubilisiert.

In der hier vorgestellten Aufreinigungsprozedur werden die Halbkanäle vor der zweiten Gelfiltration zunächst spinmarkiert, um sie anschließend mittels des Detergenzes 8-GLU zu solubilisieren. Das connexinspezifische Elutionsprofil der zweiten Gelfiltration belegt, daß die Solubilisierung von Halbkanalstrukturen gelang. Die Ergebnisse belegen aber auch, daß unter den hier gewählten Bedingungen der Solubilisierungsprozeß nicht vollständig ist. Möglicherweise kann durch die Wahl einer längeren Solubilisierungszeit oder eines anderen Detergenzes eine Optimierung erreicht werden.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß es der in dieser Arbeit beschrittene Weg einer 2-Schritt-Gelfiltration erlaubt, Connexone unter milden Bedingungen in einem nichtionischen Detergenz mit einer sehr hohen Reinheit aus der Zellmembran zu isolieren.

4.2.3. Solubilisierung und Aufreinigung durch ein 6xHis-Epitop

Eine Aufreinigung des Cx43, das C-terminal mit einem 6xHis-Epitop fusioniert war, über eine Nickelchelatsäule gelang quantitativ nur unter denaturierenden Bedingungen. Dies legt den Schluß nahe, daß das 6xHis-Epitop in der nativen Form des Cx43 nicht an die Nickelchelatomatrix binden konnte, wofür es zwei mögliche Erklärungen gibt. Zum einen könnte der C-Terminus eine solche Tertiärstruktur aufweisen, daß das 6xHis-Epitop sich im Inneren dieses ca. 13 kD Proteinbereichs befindet. Zum anderen könnte ein freiliegendes 6xHis-Epitop mit der potentiellen Histidin-Bindungsstelle des C-Terminus wechselwirken. Diese Bindungsstelle geht im sogenannten „ball-and-chain“-Modell eine Wechselwirkung mit Histidin 95 am Kanaleingang ein und ist für den Öffnen- und Schließenmechanismus des Kanals mitverantwortlich (Ek *et al.*, 1994). Beide Erklärungsmodelle haben zur Folge, daß das 6xHis-Epitop nicht mit den Nickelionen adäquat wechselwirken kann und daher der Halbkanal nicht an die Matrix gebunden werden kann.

Möglicherweise können ausreichend milde Denaturierungsbedingungen gefunden werden, die einerseits eine Freilegung des 6xHis-Epitops für die Nickelchelatchromatographie erlauben, andererseits die Renaturierung des Connexins nach der Elution ermöglichen. Ebenso denkbar ist die für einige Versuchsansätze bereits verwandte Abspaltung des C-Terminus auf der cDNA-Ebene (Unger *et al.*, 1997; 1999 a, b; Morely 1996) und der Fusion dieses verkürzten Connexins mit einem 6xHis-Epitop.

4.3. Untersuchung von Halbkanälen

Wenn in Plasmamembranen Halbkanäle vorkommen sollten, die für eine signifikante Zeitdauer geöffnet sein können, so ist die Vitalität der Zelle beeinflussbar. Das endogene *Xenopus* Cx38 (Ebihara, 1995) sowie heterolog im *Xenopus* Oozyten-Expressionssystem synthetisierte Connexine können durch niedrige extrazelluläre Kalziumkonzentrationen oder lange depolarisierende Spannungen zum Öffnen von Halbkanälen veranlaßt werden (Paul *et al.*, 1991; Ebihara and Steiner, 1993; Gupta *et al.*, 1994; Ebihara *et al.*, 1995; Trexler *et al.*, 1996). Die endogenen Halbkanäle sind so reguliert, daß sie unter normalen Bedingungen im geschlossenen Zustand vorliegen. Auch von anderen Zellsystemen sind apparente Halbkanalströme bekannt (DeVries and Schwartz, 1992; Malchow *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995).

Halbkanäle können nicht konstitutiv geöffnet sein, allerdings ist ein reguliertes Öffnen möglich. Die biologische Funktion von funktionalen Halbkanälen in der Zellmembran ist Gegenstand der augenblicklichen Diskussion. Favorisierte Hypothesen sind Funktionen bei der Verletzung von Geweben oder eine Koordinierung der Bildung eines Gap Junction Kanals.

Biochemische, physiologische und strukturelle Untersuchungen zeigen, daß die molekularen Komponenten, die für die Kanalübergänge und Kanalempfindlichkeiten verantwortlich sind, für jeden Halbkanal einzeln und unabhängig voneinander existieren und nicht eine molekulare Komponente von beiden Halbkanälen geteilt wird (Makowski *et al.*, 1977; Unwin and Zampighi,

1980; Spray *et al.*, 1991). In einigen Fällen verhalten sich Gap Junction Kanäle so, als würden die Halbkanäle unabhängig voneinander arbeiten (DeVries and Schwartz, 1992). In Blastomeren von Teleostei führt eine pH-Erniedrigung in einer von zwei gekoppelten Zellen zu einer ungleichen Spannungsempfindlichkeit. In der Zelle mit erniedrigtem pH-Wert scheint der Spannungssensor in einer bisher unbekannten Weise verändert, während der Spannungssensor der anderen Zellen unbeeinflusst bleibt.

Werden zwei gepaarte Oozyten so mit mRNAs transfiziert, daß die Oozyten unterschiedliche Connexine exprimieren, verhalten sich die daraus gebildeten Gap Junction Kanäle so, als seien sie lineare Kombinationen zweier unabhängig voneinander arbeitender Halbkanäle (Swenson *et al.*, 1989; Werner *et al.*, 1989; Ebihara *et al.*, 1995). Unterschiede in der Spannungsempfindlichkeit heterotypischer Gap Junction Kanäle werden durch die Gleichrichtung des Kanalstroms verursacht. Diese Gleichrichtung entsteht, wenn der Gap Junction Kanal zwei ungleiche Stromleitungswege in Serie geschaltet hat (Suchyna *et al.*, 1994; Bukauskas *et al.*, 1995).

Diese Ergebnisse belegen, daß eine genaue Untersuchung der Funktionsweisen eines Halbkanals für das Verständnis der Funktionsweise eines Gap Junction Kanals wichtig ist. In den Fällen, in denen eine funktionale Wechselwirkung zwischen Halbkanälen festgestellt wurde (Hennemann *et al.*, 1992; Bruzzone *et al.*, 1994a), kann der Vergleich mit den Eigenschaften der Halbkanäle klären, welche Eigenschaften der Gap Junction Kanäle durch kooperative Effekte entstehen.

4.4. ESR-Spektroskopie

Die 2-Schritt-Gelfiltration zur Aufreinigung von Cx43-Halbkanälen erlaubt die Durchführung ESR-spektroskopischer Messungen des spinmarkierten Cx43-Halbkanals. Wie hier gezeigt wurde, besitzt der Cx43-Wildtyp drei freie Cysteinreste, an die ein Spinlabelmolekül binden kann. Foote *et al.* (1998) wiesen nach, daß die sechs Cysteinreste der extrazellulären Loops durch intramolekulare Disulfidbrücken oxidiert sind und somit keine Spinlabelmoleküle binden können. Die drei freien Cysteinreste sind im C-Terminus zu vermuten, was durch eine Abspaltung dieser Proteindomäne vor der zweiten Gelfiltration und anschließender ESR-Spektroskopie des C-Terminus sowie des Restproteins nachweisbar wäre.

Das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis der Cx43-ESR-Spektren ist durch den Einsatz größerer Zellzahlen zu Beginn der Aufreinigung möglich. Zusätzlich ist eine quantitative Optimierung der Solubilisierung der Halbkanalstrukturen vor der 2. Gelfiltrationsschritt anzustreben.

Strukturelle Informationen über den Cx43-Halbkanal sind durch das Cysteinscreening zu erhalten. Durch den sukzessiven Ersatz eines Aminosäurerestes des Wildtypproteins durch einen Cysteinrest, an den das Spinlabelmolekül binden kann, wird durch ESR-spektroskopische Methoden ein Abbild der Struktur- und Funktion interessierende Proteindomänen erzeugt (Steinhoff *et al.*, 1995). Da das Wildtyp-Cx43 bereits über freie Cysteinreste wie hier gezeigt verfügt, müssen

Kontrollproben des Cx43-Wildtyps gegen die Cysteinmutanten gemessen werden. Das Spektrum des Wildtypproteins kann nun vom Spektrum der Cysteinmutante subtrahiert werden.

Unter der Voraussetzung, daß die detektierten freien Cysteinreste sich im C-Terminus befinden, wäre die Deletion des C-Terminus eine weitere Möglichkeit diese Cysteinreste ESR-spektroskopisch nicht berücksichtigen zu müssen. In Anlehnung an die Arbeiten von Unger *et al.* (1997, 1999 a, b) könnten strukturelle Untersuchungen der membranständigen Domänen, der Loopregionen sowie des N-Terminus vorgenommen werden.

4.5. Ausblick

Für Gap Junction Kanäle oder Cx-Halbkanäle existieren keine Strukturdaten auf der Ebene der Aminosäurereste. Der hier vorgestellte Weg einer Überexpression von Cx43-Halbkanälen in stabil transfizierten Insektenzellen und der anschließenden Aufreinigung durch eine 2-Schritt-Gelelektrophorese stellt die methodischen Voraussetzungen dar, ESR-spektroskopische Untersuchungen an Cx43-Halbkanälen vorzunehmen. Zukünftig können Daten über die Lage und Dynamik einzelner Aminosäurereste gewonnen werden, die durch das sukzessive Cysteinscreening zu einem strukturellen Bild einer interessierenden Cx-Domäne zusammengefügt werden können. Hierdurch ist eine strukturelle und funktionelle Aufklärung von Cx43-Halbkanälen auf der Ebene einzelner Aminosäurereste möglich. So ist es von großem Interesse nachzuweisen, daß die transmembrane M3-Domäne die Pore auskleidet. Ebenso kann die Struktur und Lage der anderen membranständigen Domänen erarbeitet werden. Auch die Übergänge der Cx43-Polypeptidkette aus der Membran in die wässrige Lösung können aufgeklärt werden. Nicht zuletzt ist eine strukturelle und dynamische Untersuchung des Öffnen und Schließens der Membranpore realisierbar.

5. Zusammenfassung

Connexine stellen die strukturelle Grundeinheit der Zell-Zell-Kommunikation dar. Die als Gap Junction Kanäle bezeichneten Connexin-Dodekamere bilden in sich gegenüberliegenden Zellmembranen eine wassergefüllte Pore aus. Die Innenräume zwei benachbarter Zellen werden so verknüpft, um den Austausch von Ionen und kleineren Molekülen zu erlauben. Die zum Verständnis der Funktion dieser Kanäle notwendige Strukturaufklärung liefert bisher Daten unzureichender Auflösung. Die hier am erfolgreichsten verwandte Methode der Elektronen-Kryo-Mikroskopie benötigt die als Gap Junction Plaques bezeichneten zweidimensionalen Kristalle. Bisher existiert keine Isolationsmethode für diese Kristalle, die eine solcher Reinheit ermöglicht, daß eine Strukturaufklärung mit einer Auflösung in der Größenordnung der Aminosäureseitenketten erreicht wird.

Die Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR-Spektroskopie) stellt einen neuen Ansatz für die strukturelle Untersuchung von Connexinen dar, da sie auf die Isolation von zweidimensionalen Kristallen verzichtet. So können auch solubilisierter Proteinkomplexe strukturell untersucht werden. Die ESR-Spektroskopie benötigt hochreine Proteinproben, wobei die Möglichkeit der Solubilisierung des untersuchten Proteins weitergehende Aufreinigungsmethoden erlaubt, als sie für die kristallinen Gap Junctions möglich ist. Aufgrund der benötigten Proteinmengen verlangt die ESR-Spektroskopie ein Überexpressionssystem für das zu untersuchende Protein. Essentiell für die ESR-Spektroskopie ist die Möglichkeit zur ortsspezifischen Mutagenese nativer Aminosäuren zu Cysteinresten. An diese Cysteinreste wird die das ESR-Signal verursachende Spinsonde als Reportermolekül kovalent gebunden.

In dieser Arbeit konnte erstmals ein Connexin, Cx43, stabil in Insektenzellen exprimiert werden. Dieses heterologe Expressionssystem ermöglicht die posttranslationale Aggregation der Connexine zu Halbkanalstrukturen, wie eine Molekulargewichtsbestimmung mittels einer Gelfiltration des solubilisierten Proteins zeigte. Eine immunhistochemische Untersuchung lokalisierte die Connexine in der Zellmembran. Eine Zellfraktionierung bestätigte, daß die exprimierten Connexine ausschließlich in der Membran und nicht im Cytosol zu finden waren. Die Insektenzellen erwiesen sich über den gesamten Untersuchungszeitraum von mehreren Wochen als stabil Cx43 exprimierend. Die Syntheseleistung lag bei ca. 10 mg Cx43-Protein pro Liter Insektenzellen-Schüttelkultur. Das hier eingesetzte eukaryonte Expressionssystem erlaubte die Erzeugung stabiler Transfektanten innerhalb von 17 Tagen. Diese vergleichsweise schnelle Etablierung stabiler, überexprimierender eukaryonter Transfektanten ist im Hinblick auf das für die ESR-Spektroskopie typische Cysteinscreening von großem Vorteil. Für dieses Cysteinscreening konnte eine erste Cysteinmutante, K146C, kloniert und in den Insektenzellen zur Expression gebracht werden.

Weitere Expressionssysteme wurden unter dem Blickwinkel der Bedürfnisse der ESR-Spektroskopie getestet. So zeigte die *in vitro*-Transkription und -Translation von Connexinen zwar

die Aggregation der Monomere zu Halbkanälen, jedoch waren die exprimierbaren Proteinnengen um Größenordnungen zu gering.

Im Hinblick auf eine funktionelle Aufreinigung von Halbkanalstrukturen wurde ein 6xHis-Epitop N-terminal an das Cx46-Gen fusioniert. Die Expression eines solchen Proteins gelang weder in HeLa-Zellen noch in Insektenzellen, was im Zusammenhang mit der Schaltfunktion des N-Terminus für das Öffnen und Schließen der Kanäle zu sehen ist. So könnte das zusätzliche N-terminale Peptid das Öffnen des membranständigen Halbkanals verursachen und damit die Zellmembran als Diffusionsbarriere kurzschließen. Dies mindert die Vitalität der Zelle.

Die C-terminale Klonierung des 6xHis-Epitops erlaubte die funktionelle Expression von Cx43 in Insektenzellen. Jedoch erwies sich die native Aufreinigung im Gegensatz zur denaturierenden Aufreinigung über eine Nickelchelatsäule als nicht quantitativ. Als Ursache muß eine sterische Blockade des 6xHis-Epitops angesehen werden, die eine effektive Bindung an die Säule verhindert.

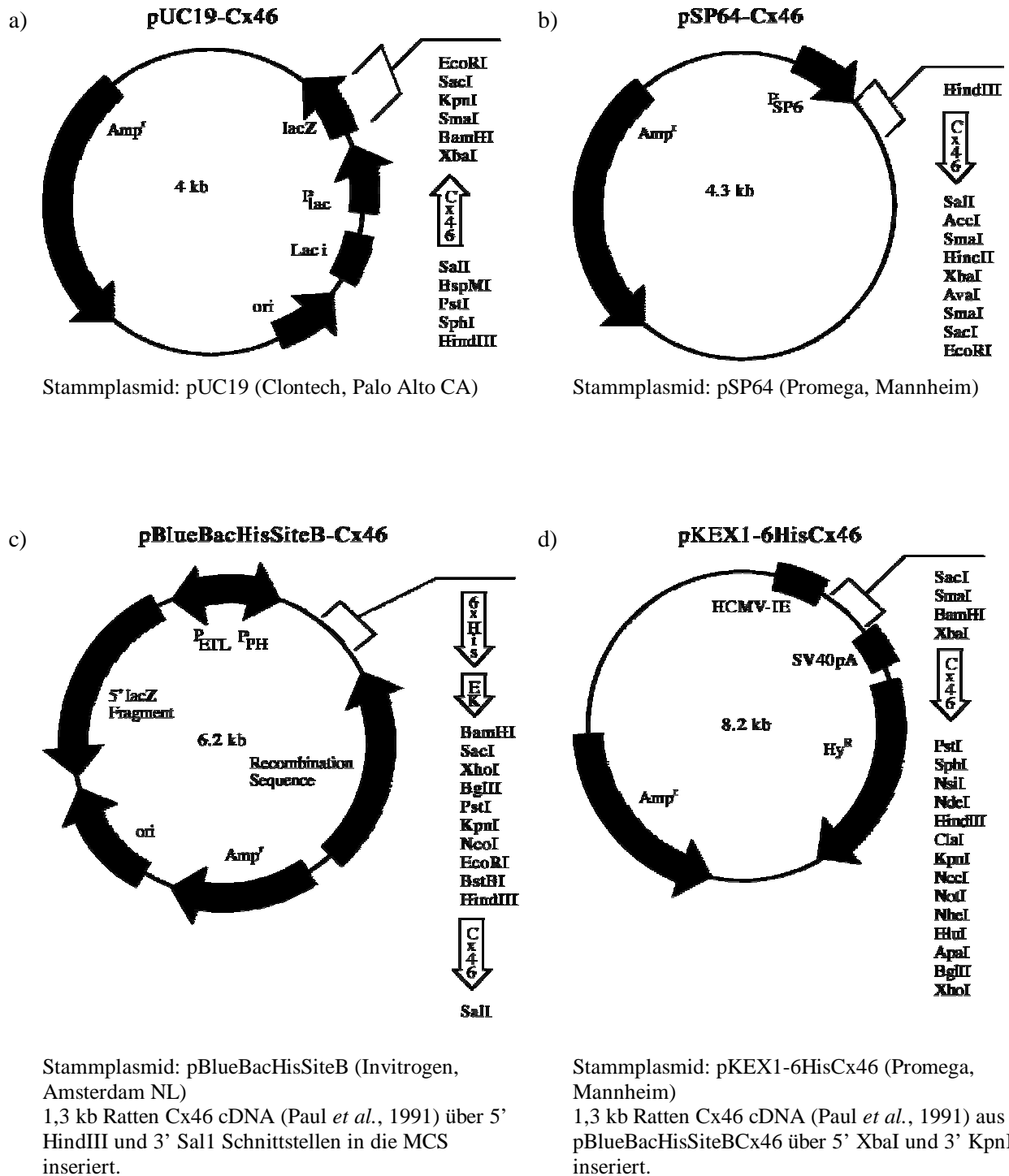
Bisher verwandte Aufreinigungsmethoden für Connexine waren entweder von mangelnder Reinheit oder denaturierten das Protein irreversibel. In dieser Arbeit konnte eine neue Aufreinigungsmethode für Connexine etabliert werden, die Zwei-Schritt-Gelfiltration. Sie erlaubt die Isolation hochreiner Cx-Halbkanäle unter nativen Bedingungen. Hierbei konnte gänzlich auf extreme pH-Werte oder Reduktionsmittel verzichtet werden, was für die Aufreinigung von Connexinkomplexen von außerordentlich Bedeutung ist. In einem ersten Schritt wurden Aggregate von Cx43-Halbkanälen gebildet und vom Großteil der restlichen Membranproteine mittels einer Gelfiltration getrennt. Im zweiten Schritt wurden diese Aggregate wieder in einzelne Cx43-Halbkanäle aufgelöst. Durch eine erneute Gelfiltration konnten die verunreinigende Fremdproteine von den Cx43-Halbkanälen getrennt werden. Die so gewonnenen Cx43-Halbkanäle waren von solcher Reinheit, daß keine Fremdproteine nachgewiesen werden konnten.

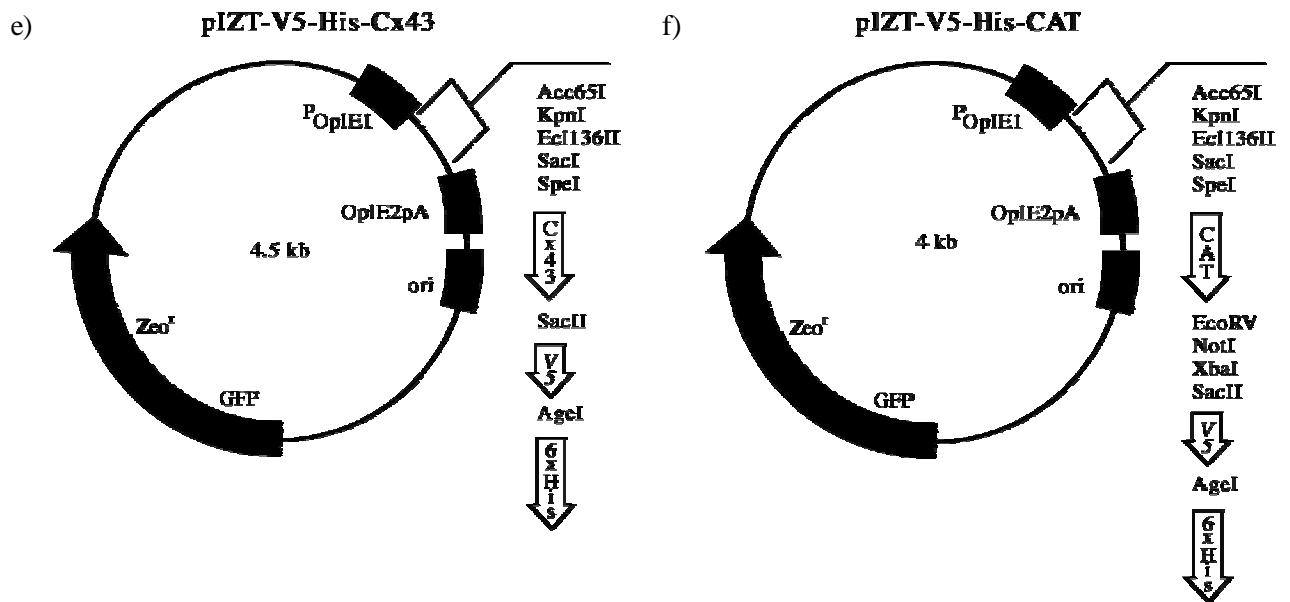
Erste ESR-Spektren von Wildtyp-Cx43-Halbkanälen konnten aufgezeichnet werden. Sie belegen, daß drei der neun nativen Cysteine des Cx43 für die Spinsonde zugänglich sind und diese kovalent binden.

Mit dieser Arbeit wurde ein Weg zur Expression ausreichender Connexinmengen erarbeitet. Die Isolation hochreiner Cx-Halbkanäle unter nativen Bedingungen für ESR-spektroskopische Untersuchungen wurde etabliert. Die ortsspezifische Mutagenese des Connexingens konnte durchgeführt werden und diese Mutante zur Expression gebracht werden. Somit ist nun eine detaillierte Untersuchung der Struktur von Connexinen durch das ESR-spektroskopische Cysteinscreening möglich.

6. Anhang

6.1. Plasmidkarten





Stammaplasmid: pIZT-V5-His-Cx43 (Invitrogen, Amsterdam, NL)
 1,2 kb Ratten Cx43 cDNA (Beyer *et al.*, 1987) über 5' SpeI und 3' SacII in die MCS kloniert.

kommerzieller Vektor (Invitrogen, Amsterdam, NL)

Abb. 6.1.: Die in dieser Arbeit eingesetzten Klonierungs- und Transfektionsvektoren.

7. Literatur

- Adam G, Luger P, und Stark G (1988) Physikalische Chemie und Biophysik, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Altenbach C, Marti T, Khorana HG, and Hubbell WL (1990) Transmembrane protein structure: spin labeling of bacteriorhodopsin mutants. *Science* 248 : 1088-1092.
- Atkinson MM, and Sheridan JD (1988) Altered junctional permeability between cells transformed by v-ras, v-mos, or v-src. *Am. J. Physiol.* 255 : C674-C683.
- Azarnia R, Reddy S, Kmiecik TE, Shalloway D and Loewenstein WR (1988) The cellular src gene product regulates junctional cell-to-cell communication. *Science* 239 : 398-401.
- Barr L, Dewey MM, and Berger W (1965) Propagation of action potentials and the structure of the nexus in cardiac muscle. *J. Gen. Physiol.* 48 : 797-823.
- Beblo DA, Wang HZ, Beyer EC, Westphale EM, and Veenstra RD (1995) Unique conductance, gating, and selective permeability properties of gap junction channels formed by connexin40. *Circ. Res.* 77 : 813-822.
- Bennett MVL, and Verselis VK (1992) Biophysics of gap junctions. *Semin. Cell Biol.* 3 : 29-47.
- Bennett MVL, Barrio LC, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, and Saez JC (1991) Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron* 6 : 305-320.
- Bennett MVL, Verselis VK, White RL, and Spray DC (1988) Multiplicity of controls of gap junctional communication. *Modern Cell Biology* 7 : 287-304.
- Bevans, CG, Kordel M, Rhee SK, and Harris AL (1998) Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *J. Biol. Chem.* 273 : 2808-2816.
- Beyer EC, Paul DL, and Goodenough DA (1990) Connexin family of gap junction proteins. *J. Membr. Biol.* 116 : 187-194.
- Beyer EC, Paul DL, and Goodenough DA (1987) Connexin43: A protein from rat heart homologous to gap junction protein from liver. *J. Cell Biol.* 105 : 2621-2629.
- Brink PR, Cronin K, Banach K, Peterson E, Westphale EM, Seul KH, Ramanan SV, and Beyer EC (1997) Evidence for heteromeric gap junction channels formed from rat connexin43 and human connexin37. *Am. J. Physiol.* 273 : C1386-C1396.
- Bruzzone R, White TW, and Paul DL (1994a) Expression of chimeric connexins reveals new properties of the formation and gating behavior of gap junction channels. *J. Cell Sci.* 107 : 955-967.
- Bruzzone R, White TW, and Paul DL (1996) Connections with connexins: The molecular basis of direct intercellular signalling. *Eur. J. Biochem.* 238 : 1-27
- Buehler LK, Stauffer KA, Gilula NB, and Kumar NM (1995) Single channel behavior of recombinant β_2 gap junction connexons reconstituted into planar lipid bilayers. *Biophys. J.* 68 : 1767-1775.

- Bukauskas FF, Elfgang C, Willecke K, and Weingart R (1995) Heterotypic gap junction channels (connexin26-connexin32) violate the paradigm of unitary conductance. *Pflugers Arch.* 429 : 870-872.
- Bukauskas FF, Jordan K, Bukauskiene A, Bennet MV, Lampe PD, Laird DW, and Verselis VK (2000) Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 : 2556-2561.
- Burt JM, and Spray DC (1988) Single-channel events and gating behavior of the cardiac gap junction channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 : 3431-3434.
- Camels T, Parriche M, Burand H, and Tiraby G (1991) High efficiency transformation of *Tolypocladium geodes* conidiospores to phleomycin resistance. *Curr. Genet.* 20 : 309-314.
- Cao F, Eckert R, Elfgang C, Nitsche JM, Snyder SA, Hülser DF, Willecke K, and Nicholson BJ (1998) A quantitative analysis of connexin-specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and *Xenopus* oocytes. *J. Cell Sci.* 111 : 31-43.
- Cascio M, Gogol E, and Wallace BA (1990) The secondary structure of gap junctions: influence of isolation methods and proteolysis. *J. Biol. Chem.* 265,4 : 2358-2364.
- Caspar DLD, Goodenough DA, Makowski L, and Phillips WC (1977) Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction. *J. Cell Biol.* 74 : 605-628.
- Colley KJ, Lee EU, and Paulson JC (1992) The signal anchor and stem regions of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase may each act to localize the enzyme to the golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 267 : 7784-7793.
- Cornish VW, Benson DR, Altenbach CA, Hideg K, Hubbell WL, and Schultz PG (1993) Site-specific incorporation of biophysical probes into proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 : 2910-2914.
- Dahl G, Miller T, Paul D, Voellmy R, and Werner R (1987) Expression of functional cell-to-cell channels from cloned rat liver gap junction complementary DNA. *Science* 236 : 1290-1293.
- Davis TR, Trotter KM, Granados RR, and Wood HA (1992) Baculovirus expression of alkaline phosphatase as a reporter gene for evaluation of production, glycosylation, and secretion. *Bio/Technology* 10 : 1148-1150.
- Dermitzel R, Hwang TK, and Spray DS (1990) The gap junction family: structure, function and chemistry. *Anat. Embryol.* 182 : 517-528.
- DeVries SH and Schwartz EA (1992) Hemi-gap-junction channels in solitary cells of the cat fish retina. *J. Physiol.* 445 : 201- 230.
- Drocourt D, Calmels TPG, Reynes JP, Baron M, and Tiraby G (1990) Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nucleic Acids Res.* 18 : 4009.
- Ebihara L, and Steiner E J (1993) Properties of a nonjunctional current expressed from a rat connexin46 cDNA in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 102 : 59-74.
- Ebihara L, Berthoud VM, and Beyer EC (1995) Distinct behavior of connexin56 and connexin46 gap junctional channels can be predicted from the behavior of their hemi-gap-junctional channels. *Biophys. J.* 68 : 1796-1803.

- Eghbali B, Kessler JA, and Spray DC (1990) Expression of gap junction channels in communication-incompetent cells after stable transfection with cDNA encoding connexin 32. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 : 1328-1331.
- Ek JF, Delmar M, Perzova R, and Taffet SM (1994) Role of His 95 in pH gating of the cardiac gap junction protein. *Circ Res* 74 : 1058-1064.
- Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Fraté H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hülser DF, and Willecke K (1995) Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.* 129 : 805-817.
- Engel A, Hoenger A, Hefti A, Henn C, Ford RC, Kistler J, and Zulauf M (1992) Assembly of 2-D membrane protein crystals: Dynamics, crystal order and fidelity of structure analysis by electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 109 : 219-234.
- Engel A, Lampe PD, and Kistler J (1993) In-vitro assembly of lens gap junctions. *Progress in cell research* 3 : 61-68.
- Falk MM, Buehler LK, Kumar NM and Gilula NB (1997) Cell-free synthesis and assembly of connexins into functional gap junction membrane channels. *EMBO J.* 16 : 2703-2716.
- Falk MM, Kumar NM, and Gilula NB (1994) Membrane insertion of gap junction connexins: polytopic channel forming membrane proteins. *J. Cell Biol.* 127 : 343-355.
- Finbow M, Yancey SB, Johnson R, and Revel JP (1980) Independent lines of evidence suggesting a major gap junctional protein with a molecular weight of 26,000. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77 : 970-974.
- Fishman GI, Moreno AP, Spray DC, and Levinwand LA (1991) Functional analysis of human cardiac gap junction channel mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 : 3525-2529.
- Fishman GI, Spray DC, and Levinwand LA (1990) Molecular characterization and functional expression of the human cardiac gap junction channel. *J. Cell Biol.* 111 : 589-598.
- Foote CI, Zhou I, Zhu X, and Nicholson BJ (1998) The pattern of disulfid linkages in the extracellular loop region of connexin 32 suggests a model for the docking interface of gap junctions. *J. Cell Biol.* 140 : 1187-1197.
- Gabriel HD, Jung D, Butzler C, Temme A, Traub O, Winterhager E, and Willeke K (1998) Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J Cell Biol* 140 : 1453-1461.
- Garfield RE, Simms S, and Daniel EE (1977) Gap junctions: their presence and necessity in myometrium during parturition. *Science* 198 : 958-960.
- Garfield RE, Simms SM, Kannan MS and Daniel EE (1978) Possible role of gap junctions in activation of myometrium during parturition. *Am. J. Physiol.* 235 : C168-179.
- Garfield RE, and Hayashi RH (1980) Presence of gap junctions in the myometrium of women during various stages of menstruation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 138(5) : 569-574.
- Galla HJ, Hrsg., (1988) *Spectroscopische Methoden in der Biochemie* (Thieme Verlag, Stuttgart, New York).
- Ghoshroy S, Goodenough DA, and Sosinsky GE (1995) Preparation, characterization and structure of half gap junctional layers split with urea and EGTA. *J. Membrane Biol.* 146 : 15-28.

- Gong X, Li E, Klier G, Huang Q, Wu Y, Lei H, Kumar NM, Horwitz J, and Gilula NB (1997) Disruption of alpha3 connexin gene leads to proteolysis and catarctogenesis in mice. *Cell* 91 : 833-43.
- Goodenough DA, and Stoekenius W (1972) The isolation of mouse hepatocyte gap junctions. Preliminary chemical characterization and x-ray diffraction. *J. Cell Biol.* 54 : 646-656.
- Goodenough DA, Dick JS 2d, and Lyons JE (1980) Lens metabolic cooperation: a study of mouse lens transport and permeability visualized with freeze-substiution autoradiogrphy and elektron microscopy. *J. Cell Biol.* 86 : 576-589.
- Goodenough DA, Goliger JA, and Paul DL (1996) Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem.* 65 : 475-502.
- Granados RR, Guoxun L, Derksen ACG, and McKenna KA (1994) A new insect cell line form *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 64 : 260-266.
- Grosch HW and Hasilik A (1998) Protection of proteolysis-prone recombinant proteins in baculovirus expression systems. *BioTechniques* 24 : 930-934.
- Grummer R, Hellmann P, Traub O, Soares MJ, el-Sabban ME, and Winterhager E (1996) Regulation of connexin31 gene expression upon retinoic acid treatment in rat choriocarcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 227 : 23-32.
- Gupta VK, Berhoud VM, Atal N, Jarillo JA, Barrio L, and Beyer EC (1994) Bovine connexin44, a lens gap junction protein: molecular cloning, immunologic characterization, and functional expression. *Inverst. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35 : 3747- 3458.
- Havelka WA, Henderson R, Heymann JAW and Oesterhelt D (1993) Projection structure of halorhodopsin from *Halobacterium halobium* at 6 Å resolution obtained by electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* 234 : 837-846.
- Hebert H, Schmidt-Krey I, Morgenstern R, Murata K, Hirai T, Mitsuoka K, and Fujiyoshi Y (1997) The 3.0 Angström projection structure of microsomal glutathione transferase as determinded by electron crystallogrphy of p2₁2₁2 two-dimensional crystals. *J. Mol. Biol.* 271 : 751-758.
- Hegedus DD, Pfeifer TA, Hendry J, Theilmann DA, and Grigliatti TA (1998) A series of broad host range shuttle vectors for constitutive and inducible expression of heterologous proteins in insect cell lines. *Gene* 207 : 241-249.
- Hellmann P, Grummer R, Schirrmacher K, Rook M, Traub O, and Winterhager E (1999) Transfection with different connexin genes alters growth and differentiation of human choriocarcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 246 : 480-490.
- Henderson D, Eibel M, and Weber K (1979), Structure and biochemistry of mouse hepatic gap junctions. *J. Mol. Biol.* 132 : 193-218.
- Hennemann H, Suchyna T, Lichtenberg-Frate H, Jungbluth S, Dahl E, Schwarz J, Nicholson BJ, and Willecke K (1992) Molecular cloning and functional expression of mouse connexin40, a second gap junction gene preferentially expressed in lung. *J. Cell Biol.* 117 : 1299-1310.
- Hertzberg EL (1983) Isolation and characterization of liver gap junctions. *Methods Enzymol.* 98 : 301-310.

- Hertzberg EL (1984) A detergent-independent procedure for the isolation of gap junctions from rat liver. *J. Biol. Chem.* 259 : 9936-9943.
- Ho SN, Hunt HD, Horten RM, Pullen, JK, and Pease LR (1989), Site directed mutagenesis by overlap-extension using the polymerase-chain-reaction. *Gene* 77 : 51-59.
- Hülser DF, and Webb DJ (1973) Relation between ionic coupling and morphology of established cells in culture. *Exp. Cell Res.* 80 : 210-222.
- Israelachvili JN, Marcelja S, and Horn RG (1980) Physical principles of membrane organisation. *Q. Rev. Biophys.* 13 : 121-200
- Jap BK, and Li H (1995) Structure of the osmo-regulated H₂O-channel, AQP-CHIP, in projection at 3.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 251 : 413-420.
- Jap BK, Zulauf M, Scheybani T, Hefti A, Baumeister W, Aebersold U, and Engel A (1992) 2D crystallization: From art to science. *Ultramicroscopy* 46 : 45-84.
- Karrasch S, Bullough PA, and Ghosh R (1995) The 8.5 Å projection map of the light-harvesting complex I from *Rhodospirillum rubrum* reveals a ring composed of 16 subunits. *EMBO J.* 14 : 631-638.
- King LA, and Possee RD (1992) The baculovirus expression system: a laboratory guide. Chapman and Hall, New York.
- Kistler J, Goldie K, Donaldson P, and Engel A (1994) Reconstitution of native-type noncrystalline lens fiber gap junctions from isolated hemichannels. *J. Cell Biol.* 126 : 1047-1058.
- Koval M, Harley JE, Hick E, and Steinberg TH (1997) Connexin46 is retained as monomers in a trans-golgi-compartment of osteoblastic cells. *J. Cell Biol.* 137 : 847-857.
- Kühlbrandt W (1992) Two-dimensional crystallization of membrane proteins. *Q. Rev. Biophys.* 25 : 1-49.
- Kühlbrandt W, and Downing KH (1989) Two-dimensional structure of plant light-harvesting complex at 3.7 Å resolution by electron crystallography. *J. Mol. Biol.* 207 : 823-828.
- Kumar NM, and Gilula NB (1992) Molecular biology and genetics of gap junction channels. *Semin. Cell Biol.* 3 : 3-16.
- Kumar NM, and Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84 : 381-388.
- Kumar NM, Friend DS, and Gilula NB (1995) Synthesis and assembly of human β_1 gap junctions in BHK cells by DNA transfection with th human β_1 cDNA. *J. Cell Sci.* 108 : 3725-3734.
- Laemmle UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
- Lampe PD, Kistler J, Hefti A, Bond J, Müller S, Johnson RG, and Engel A (1991) In vitro assembly of junctions. *J. Struct. Biol.* 107 : 281-290.
- Lau AF, Kanemitsu MY, Kurata WE, Danesh S, and Boynton AL (1992) Epidermal growth factor disrupts gap-junctional communication and induces phosphorylation of connexin43 on serine. *Mol. Biol. Cell* 3 : 865-874.

- Liu TF, Li HY, Atkinson MM, and Johnson RG (1995) Intracellular lucifer yellow leakage from Novikoff cells in the presence of ATP or low extracellular Ca: evidence for hemi-gap junction channels. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 17 : 23-28.
- Loewenstein WR (1981) Junctional intercellular communication: The cell-to-cell membrane channel. *Physiol. Rev.* 61 : 829-913.
- Loewenstein WR (1984) Intercellular communication and the control of growth: XII. Alteration of junctions permeability by simian virus 40. Roles of the large and small T antigens. *Biochem. Soc. Symp.* 50 : 43-58.
- Loo LW, Berestecky JM, Kanemitsu MY, and Lau AF (1995) pp60src-mediated phosphorylation of connexin 43, a gap junction protein. *J. Biol. Chem.* 270 : 12751-12761.
- Makowski L, Caspar DLD, Phillips WC, and Goodenough DA (1977) Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data *J. Cell Biol.* 74 : 629-645.
- Malchow RP, Qian H, and Ripps H (1993) Evidence for hemi-gap junctional channels in isolated horizontal cells of the skate retina. *J. Neurosci. Res.* 35 : 237-245.
- Maldonado PE, Rose B, and Loewenstein WR (1988) Growth factors modulate junctional cell-to-cell communication. *J. Membr. Biol.* 106, 203-210.
- Manjunath CK, Goings GE, and Page E (1985) Proteolysis of cardiac gap junctions during their isolation from rat hearts. *J. Membr. Biol.* 85 : 159-168.
- Mitra AK, van Hoek AN, Wiener MC, Verkan AS and Yeager M (1995) The CHIP28 water channel visualized in ice by electron crystallography. *Nat. Struct. Biol.* 2 : 726-729.
- Moreno AP, Eghbali B, and Spray DC (1991a) Connexin32 gap junction channels in stably transfected cells: Unitary conductance. *Biophys. J.* 60 : 1254-1266.
- Moreno AP, Eghbali B, and Spray DC (1991b) Connexin32 gap junction channels in stably transfected cells. Equilibrium and kinetic properties. *Biophys. J.* 60 : 1267-1277.
- Morley GE, Taffet SM, and Delmar M (1996) Intramolecular interactions mediate pH regulation of connexin43 channels. *Biophys. J.* 70 : 1294-1302.
- Muccio DD, and DeLucas LJ (1985) Isolation of detergent-solubilized monomers of bacteriorhodopsin by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 326 : 243-250.
- Nekrosova E, Sosinskaya A, Natochin M, Lancet D, and Gat U (1996) Overexpression, solubilization and purification of rat and human olfactory receptors. *Eur. J. Biochem.* 238 : 28-37.
- Nicholson BJ, and Revel JP (1983) Gap junctions in liver: Isolation, morphological analysis, and quantitation. *Methods Enzymol.* 98 : 193-218.
- Nicholson BJ, Hunkapiller MW, Grim IB, Hood LE, and Revel JP (1981) Rat liver gap junction protein: properties and partial sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 : 7594-7598.
- Noma A, and Tsuboi N (1987) Dependence of junctional conductance on proton, calcium and magnesium ions in cardiac paired cells of guinea-pig. *J. Physiol.* 382 : 193- 211.

- O'Brien J, Bruzzone R, White TW, Al-Ubaidi MR, and Ripps H (1998) Cloning and expression of two related connexins from the perch retina define a distinct subgroup of the connexin family. *J Neurosci* 18 : 7625 – 7637.
- O'Reilly DR, Miller LK, and Luckow VA (1992) Baculovirus expression vectors: a laboratory manual (W. H. Freeman and Company, New York).
- Oh S, Ri Y, Bennett MVL, Trexler EB, Verselis VK, and Bargiello TA (1997) Changes in permeability caused by connexin 32 mutations underlie X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 19 : 927-938.
- Ou CW, Orsino A, and Lye SJ (1997) Expression of connexin-43 and connexin-26 in the rat myometrium during pregnancy and labor is differentially regulated by mechanical and hormonal signals. *Endocrinology* 138 : 5398-5407.
- Paul DL (1986) Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J. Cell Biol.* 1986 : 123-134.
- Paul DL, Ebihara L, Takemoto LJ, Swenson KI, and Goodenough DA (1991) Connexin46, a novel lens gap junction protein, induces voltage-gated currents in nonjunctional plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J. Cell Biol.* 115 : 1077-1089.
- Perkins GA, Goodenough DA, and Sosinsky GE (1998) Formation of the gap junction intercellular channel requires a 30° rotation for interdigitation of two apposing connexons. *J. Mol. Biol.* 277 : 171-177.
- Qiagen (1999) The QIAexpressionit: A handbook for high level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, Qiagen, Hilden.
- Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, and Rossant J (1995) Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267 : 1831-1834.
- Rhee SK, Vevans CG, and Harris AL (1996) Channel-forming activity of immunoaffinity-purified Connexin 32 in single phospholipid membranes. *Biochemistry* 35 : 9212-9223.
- Rose B, and Loewenstein WR (1975) Permeability of cell junction depends on local cytoplasmic calcium activity. *Nature* 254 : 250-252.
- Roth, MG, editor (1994) Methods in cell biology, protein expression in animal cells (Academic Press, New York).
- Saez JC, Nairn AC, Czernik AJ, Spray DC, Hertzberg EL, and Greengard P (1990) Phosphorylation of connexin 32, a hepatocyte gap-junction protein, by cAMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur. J. Biochem.* 192 : 263-273.
- Saez JC, Spray DC, Nairn AC, Hertzberg E, Greengard P, and Bennett MVL (1986) cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27-kd principal gap junction polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83 : 2473-2477.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Schertler GFX, Villa C, and Henderson R (1993) Projection structure of rhodopsin. *Nature* 362 : 770-772.

- Sikerwar SS and Unwin N (1988) Three-dimensional structure of gap junctions in fragmented plasma membranes from rat liver. *Biophys. J.* 54 : 113-119.
- Southern JA, Young DF, Heaney F, Baumgartner W, and Randall RE (1991) Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. *J. Gen Virol.* 72 : 1551-1557.
- Spray DC, and Bennett MVL (1985) Physiology and pharmacology of gap junctions. *Annu. Rev. Physiol.* 47 : 281-303.
- Spray DC, Bennett MVL, Campos de Carvalho AC, Eghbali B, Moreno AP, and Verselis VK (1991) Biophysics of gap junction channels. 97-116. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Spray DC, Harris AL, and Bennett MVL (1981) Gap junctional conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH. *Science* 211 : 712-715.
- Stagg RB, and Fletcher WH (1990) The hormone-induced regulation of contact-dependent cell-cell communication by phosphorylation. *Endocr. Rev.* 11 : 302-357.
- Stauffer KA (1995) The gap junction proteins beta 1-connexin (connexin-32) and beta 2-connexin (connexin-26) can form heteromeric hemichannels. *J. Biol. Chem* 270 : 6768-6772.
- Stauffer KA, Kumar NM, Gilula NB, and Unwin N (1991) Isolation and purification of gap junction channels. *J. Cell Biol.* 115 : 141-150.
- Steck TL (1974) The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J. Cell Biol.* 62 : 1-19
- Steinhoff HJ (1988) A simple method for determination of rotational correlation times and separation of rotational and polarity effects EPR spectra of spin-labeled biomolecules in a wide correlation time range. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 17 : 237-248.
- Steinhoff HJ, Mollaaghababa R, Altenbach C, Hideg K, Krebs M, Khorana HG, and Hubbell WL (1994) Time-resolved detection of structural changes during the photocycle of spin-labeled bacteriorhodopsin. *Science* 266 : 105-107.
- Steinhoff HJ, Mollaaghababa R, Altenbach C, Khorana HG, and Hubbell WL (1995) Site directed spin labeling studies of structure and dynamics in bacteriorhodopsin. *Biophys. Chem.* 56 : 89-94.
- Steinhoff HJ, Pfeiffer M, Rink T, Burlon O, Kurz M, Riesle J, Heuberger E, Gerwert K, and Oesterhelt D (1999) Azide reduces the hydrophobic barrier of the bacteriorhodopsin proton channel. *Biophys. J.* 76 : 2702-2710.
- Steinhoff HJ, Radzwill N, Thevis N, Lenz V, Brandenburg D, Antson A, Dodson G, and Wollmer A (1997) Determination of interspin distances between spinlabels attached to insulin: comparison of electron paramagnetic resonance data with X-ray structure. *Biophys. J.* 73 : 3287-3798.
- Suchyna TM, Xu LX, Gao F, Fournier CR, and Nicholson BJ (1993) Identification of a proline residue as a transduction element involved in voltage gating of gap junctions. *Nature* 365 : 847-849.
- Swenson KI, Jordan JR, Beyer EC, and Paul DL (1989) Formation of gap junctions by expression of connexins in *Xenopus* oocyte pairs. *Cell* 57 : 145-155

- Swenson KI, Piwnica-Worms H, McNamee H, and Paul DL (1990) Tyrosine phosphorylation of the gap junction protein connexin43 is required for the pp60v-src-induced inhibition of communication. *Cell Regul* 1: 989-1002.
- Traub O, Eckert T, Lichtenberg-Fraté H, Elfgang C, Bastide B, Scheidtmann KH, Hülser DF, and Willecke K (1994) Immunochemical and electrophysiological characterization of mureine connexin40 and -43 mouse tissues and transfected human cells. *Eur. J. Cell Biol.* 64 : 101-112.
- Trexler EB, Bennett MV, Bargiello TA, and Verselis VK (1996) Voltage gating and permeation in a gap junction hemichannel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 : 5836-5841.
- Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, and Yeager M (1999a) Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 283 : 1176-1180
- Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, and Yeager M (1999b) Expression, two-dimensional crystallization, and electron cryo-crystallography of recombinant gap junction membrane channels. *Journal of Structural Biology* 128 : 98-105.
- Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, and Yeager M (1997) Projection structure of a gap junction membrane channel at 7 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 4 : 39-43.
- Unwin PNT (1986) Is there a common design for cell membrane channels. *Nature* 323 : 12-13.
- Unwin PNT, and Henderson R (1975) Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. *J. Mol. Biol.* 94 : 425-440.
- Unwin PNT, and Zampighi G (1980) Structure of the junction between communication cells. *Nature* 283 : 545-549.
- Unwin PNT, and Ennis PD (1984) Two configurations of a channel-forming membrane protein. *Nature* 307 : 609-613.
- Veenstra RD, Wang HZ, Beblo DA, Chilton MG, Harris AL, Beyer EC, and Brink PR (1995) Selectivity of connexin-specific gap junctions does not correlate with channel conductance. *Circ. Res.* 77 : 1156-1165.
- Veenstra RD, Wang HZ, Beyer EC, and Brink PR (1994) Selective dye and ionic permeability of gap junction channels formed by connexin45. *Circ. Res.* 75 : 483-490.
- Verselis VK, White RL, Spray DC, and Bennett MVL (1986). Gap junctional conductance and permeability are linearly related. *Science* 234 : 461-464.
- Verselis VK, Ginter CS, and Bargiello TA (1994) Opposite voltage gating polarities of two closely related connexins. *Nature* 368 : 348-354.
- Walz T, Typke D, Smith BL, Agre P, and Engel A (1995) Projection map of aquaporin-1 determined by electron crystallography. *Nat. Struct. Biol.* 2 : 730-732.
- Werner R, Levine E, Rabadan-Diehl C, and Dahl G (1989) Formation of hybrid cell-cell channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 : 5380-5384.
- White RL, Doeller JE, Verselis VK, and Wittenberg BA (1990) Gap junctional conductance between pairs of ventricular myocytes is modulated synergistically by H⁺ and Ca⁺⁺. *J. Gen. Physiol.* 95 : 1061-1075.

- White TW, Paul DL, Goodenough DA, and Bruzzone R (1995) Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol. Biol. Cell* 6 : 459-470.
- Willecke K, Hennemann H, Dahl E, Jungbluth S, and Heynkes R (1991) The diversity of connexin genes encoding gap junctional proteins. *Eur. J. Cell Biol.* 56 : 1-7.
- Winterhager E, Grümmer R, Jahn E, Willeke K, and Traub O (1993) Spatial and temporal expression of cx26 and cx43 in rat endometrium during trophoblast invasion. *Dev. Biol.* 157 : 399-409.
- Yanish-Perron C, Vieira J, and Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33 : 103-119.
- Yeager M (1994) *In situ* two-dimensional crystallisation of a polytopic membrane protein: The cardiac gap junction channel. *Acta. Crystallogr. Sect. D* 50 : 632-638.
- Yeager M (1998) Structure of cardiac gap junction intercellular channels. *J. Struct. Biol.* 121 : 231-245.
- Yeager M, and Gilula NB (1992) Membrane topology and quaternary structure of cardiac gap junction ion channels. *J. Mol. Biol.* 223 : 929-948.
- Yeager M, and Nicholson BJ (1996) Structure of gap junction intercellular channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6 : 183-192.
- Yeager M, Unger VM, and Mitra AK (1999) Three-dimensional structure of membrane proteins determined by two-dimensional crystallization, electron cryomicroscopy, and image analysis. *Methods Enzymol.* 294 : 135-180.
- Zhou XW, Pfahnl A, Werner R, Hudder A, Llanes A, Luebke A, and Dahl G (1997) Identification of a pore lining segment in gap junction hemichannels. *Biophys J* 1997 : 1946-1953.

8. Abkürzungen

α_1 Connexin	43 kd Connexin Monomer
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
8-GLU	Octyl-beta-D-glucopyranosid
8-POE	Octyl-polyoxyethylen
A	Ampere
BHK	Baby Hamster Kidney
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CD	Zirkular-Dichroismus
CMC	Critical micelle concentration
cw-Spektren	Continous Wave-Spektren
Cx	Connxin
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DHPC	1,2-dipetanoyl-sn-phosphocholin
DTT	Dithiothreitol
EGFP	Enhanced Green Fluorescence Protein
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GFP	Green Fluorescence Protein
GJ	Gap Junction
HRP	Horseradishperoxidase
kb	kilobasen
MCS	Multiple Cloning Site
NiNTA	Nickelnitrilotriacetatsäure
NTA	Nitrilotriacetatsäure
s	Sekunde
V	Volt
w/v	weight per volume

9. Danksagung

Diese Arbeit hätte ohne die Unterstützung anderer nicht entstehen können. Besonderer Dank gilt daher:

- Prof. Dr. E. Winterhager, die diese Arbeit ermunternd und fordernd betreute.
- Allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Anatomie, die stets mit Rat und Tat beiseite standen.
- PD Dr. H.J. Steinhoff, der die ESR-Messungen ermöglichte.
- Dr. G. Dahl, der die cDNA der Cx46 Cysteinmutanten stiftete.
- Dr. O.Traub, für die intellektuellen und materiellen Hilfestellungen.
- Meiner Familie, die mir bei dieser Arbeit immer eine Stütze war.

10. Lebenslauf

Wuppertal, Oktober 2000

Name: Oliver Eberhard Burlon

Geburtstag: 27.11.1968 in Marburg an der Lahn

Eltern: Vater: Michael Burlon, Polizeibeamter
Mutter: Gudrun Burlon, geb. Schwarzer,
Medizinisch-technische Assistentin

Geschwister: Marc Burlon
Laura Burlon

Familienstand: verheiratet seit dem 19.07.1996

Ehefrau: Christine Burlon, geb. Storck

Kinder: Emily Zoe, geb. 04.11.1998
Nora Sofie, geb. 04.06.2000

Staatsangehörigkeit: deutsch

Anschrift: Kaiser-Wilhelm-Allee 2
42117 Wuppertal
Tel.: 0202/441989

Schulbildung: 1975 - 1976 Richtsbergschule, Marburg
1976 - 1979 Emil-von-Behring Schule, Marburg
1979 – 1980 Imanuel-Kant-Gymnasium, Münster
1980 - 1985 Martin-Luther-Schule, Marburg
1985 - 1986 Einjähriger High-School-Aufenthalt in Iowa, USA,
im Rahmen eines Stipendiums des Deutschen
Bundestages
Mai 1986 High School Diplom
1986-1988 Martin-Luther-Schule, Marburg, mit dem Abschluß der
Allgemeinen Hochschulreife
Gesamtnote 1.8

Zivildienst: 05.09.1988 – Verein zur Förderung der Integration Behinderter,
04.05.1990 Marburg, und Johanniter Unfallhilfe, Marburg

Studium: 01.10.1990 – Ruhr-Universität-Bochum, Fachrichtung: Geographie
30.09.1991:

	01.10.1991 –	Ruhr-Universität-Bochum,
	27.06.1996:	Fachrichtung: Biologie
	Sep. 1993	Schriftliche Vordiplomprüfungen
		Hauptfach Biologie 2.0
		Nebenfach Chemie 1.0
		Nebenfach Physik 2.7
	Mai 1995	Mündliche Diplomprüfungen
		Nebenfach Mikrobiologie 1.0
		Nebenfach Humangenetik 1.3
		Hauptfach Biophysik 1.0
	28.06.1995 –	Diplomarbeit bei Herrn PD Dr. H.-J. Steinhoff, Institut
	27.06.1996:	für Biophysik, Ruhr-Universität-Bochum Thema:
		Untersuchung der Struktur und Funktion des
		Bakteriorhodopsin mittels
		Elektronenspinresonanzspektroskopie: Note 1.0
	Seit Nov. 1996:	Promotion bei Frau Prof. Dr. E. Winterhager, Institut
		für Anatomie, Universität-Gesamthochschule-Essen
		Thema: Expression und Aufreinigung von Connexinen
		für ESR-spektroskopische Untersuchungen
Beschäftigungen:	Seit Sep. 2000:	Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Fuhlrott-Museums
		& Forschungsinstituts Wuppertal

11. Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Expression und Aufreinigung von Connexinen für ESR-spektroskopische Untersuchungen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Oliver Burlon befürworte.

Essen, den

(Prof. Dr. E. Winterhager)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den

(Oliver Burlon)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den

(Oliver Burlon)